

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



**“EXPRESIÓN GÉNICA DE CUATRO ACCESIONES DE QUINUA
(*Chenopodium quinoa* Willd.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR
ARSENIATO”**

El estudio es parte del proyecto: “EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y ANÁLISIS FUNCIONAL EN RESPUESTA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS ABIÓTICO EN *Chenopodium quinoa* DE DIFERENTES ZONAS ANDINAS DEL ECUADOR” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por La Dirección de Investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución, 2462-CU-P-2017.

CARLOS STALIN CARRILLO CHAGMANA

TUTORA: Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova, PhD.

CEVALLOS - ECUADOR

2021

APROBACIÓN

“EXPRESIÓN GÉNICA DE CUATRO ACCESIONES DE QUINUA
(*Chenopodium quinoa* Willd.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR
ARSENIATO”

Revisado por:



Firmado electrónicamente por:
**LILIANA PAULINA
LALALEO CORDOVA**

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdoba, PhD.

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, CARLOS STALIN CARRILLO CHAGMANA, portador de la cédula de ciudadanía número 180475787-8, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “EXPRESIÓN GÉNICA DE CUATRO ACCESIONES DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR ARSENIATO” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



CARLOS STALIN CARRILLO CHAGMANA

**“EXPRESIÓN GÉNICA DE CUATRO ACCESIONES DE QUINUA
(*Chenopodium quinoa* Willd.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR
ARSENIATO”**

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO:

FECHA



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

26/03/2021

Ing. Marco Pérez Salinas

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**EDGAR LUCIANO
VALLE
VELASTEGUI**

26/03/2021

Ing. Luciano Valle Velastegui

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JORGE ENRIQUE
DOBRONSKI ARCOS**

26/03/2021

Ing. Jorge Dobronski Arcos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EXPRESIÓN GÉNICA DE CUATRO ACCESIONES DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR ARSENIATO” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial y se respete los derechos de propiedad intelectual del proyecto al cual está asociado, así como del director del mismo.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor y del proyecto al cual está adscrito, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



CARLOS STALIN CARRILLO CHAGMANA

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la vida por permitirme alcanzar una meta más, por darme la fuerza para perseguir mis sueños y hacerlos realidad.

Doy gracias a mis padres y a mi hermano, por ser mi más grande apoyo, por su paciencia, su comprensión y su perseverancia.

A todos mis allegados, por sujetarme de la mano siempre y brindarme tantos consejos y palabras de aliento que me ayudaron a seguir adelante.

A cada uno de los docentes que me supieron brindar sus conocimientos, por su trabajo y esfuerzo realizado, contribuyendo durante mis estudios.

DEDICATORIA

A mis padres Carlos y Narcisa, por regalarme la vida y brindarme su más grande apoyo en este camino hacia lograr una meta más, han sido mi pilar fundamental en toda esta etapa, guiándome en todo momento.

A mi hermano Jimmy, mi mayor anhelo es verte triunfando en la vida e incluso siendo mejor que yo.

A todas las personas, familiares, amigos que estuvieron presentes y de alguna u otra forma supieron apoyarme en algún momento dado.

- *Carlos Stalin Carrillo Chagmana*

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| APROBACIÓN | ii |
| AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | iii |
| DERECHO DE AUTOR | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| DEDICATORIA | vii |
| ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS | viii |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | x |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| SUMMARY | xiv |
| CAPÍTULO I | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1 Antecedentes Investigativos..... | 1 |
| 1.2 Categorías Fundamentales o Marco Conceptual | 6 |
| 1.2.1 Variable independiente: Estrés por arseniato | 6 |
| 1.2.2 Variable dependiente: Expresión génica de la quinua..... | 7 |
| 1.2.3 Unidad de análisis: Quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.)..... | 9 |
| 1.3 Objetivos..... | 16 |
| 1.3.1 Objetivo general | 16 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 16 |
| 1.4 Hipótesis | 16 |
| CAPÍTULO II | 17 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| 2.1 Equipos y Materiales | 17 |
| 2.1.1 Equipos..... | 17 |
| 2.1.2 Materiales..... | 17 |
| 2.1.3 Reactivos | 18 |
| 2.2 Métodos | 19 |
| 2.2.1 Ubicación del Experimento | 19 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2.2.2 | Características del Lugar | 19 |
| 2.2.3 | Factores en Estudio | 20 |
| 2.2.4 | Diseño Experimental..... | 20 |
| 2.2.5 | Tratamientos..... | 20 |
| 2.2.6 | Procesamiento de la Información | 21 |
| 2.2.7 | Manejo del experimento | 22 |
| 2.2.8 | Extracción de ARN de las muestras a analizar | 23 |
| 2.2.9 | Síntesis de cDNA | 23 |
| 2.2.10 | Determinación de la calidad y concentración del ARN y cADN.... | 24 |
| 2.2.11 | Análisis de expresión génica por qPCR | 24 |
| 2.2.12 | Variables Respuesta | 26 |
| CAPÍTULO III | | 27 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 27 |
| 3.1 | Análisis y discusión de los resultados | 27 |
| 3.1.1 | Identificación de Genes..... | 27 |
| 3.1.2 | Expresión del Gen GST20 | 28 |
| 3.1.3 | Expresión del Gen PCS1..... | 30 |
| 3.1.4 | Expresión del Gen SODC | 33 |
| 3.1.5 | Accesión de Quinua con mayor Respuesta Génica | 35 |
| 3.2 | Verificación de Hipótesis | 36 |
| CAPÍTULO IV | | 37 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | | 37 |
| 4.1 | Conclusiones..... | 37 |
| 4.2 | Recomendaciones..... | 38 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 39 |
| ANEXOS | | 49 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Planta de quinua | 10 |
| Gráfico 2. Expresión del gen GST20 a 0.3 mM de arseniato..... | 28 |
| Gráfico 3. Expresión del gen GST20 a 0.5 mM de arseniato..... | 29 |
| Gráfico 4. Expresión del gen PCS1 a 0.3 mM de arseniato | 31 |
| Gráfico 5. Expresión del gen PCS1 a 0.5 mM de arseniato | 31 |
| Gráfico 6. Expresión del gen SODc a 0.3 mM de arseniato | 33 |
| Gráfico 7. Expresión del gen SODc a 0.5 mM de arseniato | 34 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua | 10 |
| Tabla 2. Descripción botánica y morfológica de la quinua..... | 11 |
| Tabla 3. Propiedades nutricionales de la quinua | 12 |
| Tabla 4. Condiciones agroclimáticas para el cultivo | 15 |
| Tabla 5. Tratamientos del estudio | 21 |
| Tabla 6. Componentes utilizados en la hibridación de ARN | 23 |
| Tabla 7. Componentes utilizados en la transcripción de ARN | 24 |
| Tabla 8. Componentes de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix | 25 |
| Tabla 9. Modo de ciclo estándar (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$)..... | 25 |
| Tabla 10. Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión)..... | 25 |
| Tabla 11. Genes a ser evaluados | 26 |
| Tabla 12. Genes identificados en <i>Chenopodium quinoa</i> | 27 |
| Tabla 13. Acciones de quinua con una mayor expresión génica | 35 |
| Tabla 14. Forward and reverse primers..... | 49 |
| Tabla 15. Resultados del análisis del Gen GST20 | 50 |
| Tabla 16. Resultados del análisis del Gen PCS1..... | 52 |
| Tabla 17. Resultados del análisis del Gen SODc | 54 |
| Tabla 18. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen GST20 | 57 |
| Tabla 19. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Variedad..... | 57 |
| Tabla 20. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Dosis | 57 |
| Tabla 21. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Tiempo..... | 57 |
| Tabla 22. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Tratamientos | 58 |
| Tabla 23. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen PCS1 | 59 |
| Tabla 24. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Variedad..... | 59 |
| Tabla 25. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Dosis..... | 59 |
| Tabla 26. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Tiempo | 59 |
| Tabla 27. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Tratamientos..... | 60 |
| Tabla 28. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen SODc | 61 |
| Tabla 29. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Variedad | 61 |
| Tabla 30. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Dosis..... | 61 |
| Tabla 31. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Tiempo..... | 61 |
| Tabla 32. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Tratamientos | 62 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Forward and reverse primers utilizados para el qPCR Real Time | 49 |
| Anexo 2. Resultados experimentales obtenidos en laboratorio mediante qPCR..... | 50 |
| Anexo 3. Análisis estadístico con los datos obtenidos | 57 |
| Anexo 4. Fotografías..... | 63 |

RESUMEN

El descubrimiento del genoma de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), ha permitido investigar a nivel genético muchas funciones metabólicas entre ellas la tolerancia a diferentes tipos de estrés y su relación a nivel metabólico, a partir de la identificación de genes que participan potencialmente en dichos procesos. Por lo que, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el estrés ocasionado por Arseniato aplicado a diferentes concentraciones [0.3 y 0.5 mM] que generó una respuesta a nivel transcriptómico para contrarrestar dicho estrés. El ensayo se efectuó en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, donde el material vegetal fue cultivado bajo las siguientes condiciones: temperatura interna media de 20°C y humedad relativa de 50%, para esto se emplearon bandejas de germinación con una mezcla de sustrato estéril, tierra negra y humus; una vez que las plantas alcanzaron un desarrollo foliar adecuado (5 hojas verdaderas) se sometió a estrés por arseniato, para posteriormente recolectarlas y realizar el respectivo análisis de expresión de genes. A partir de la extracción de ARN de cada muestra, se sintetizó el cDNA y posteriormente se realizó el análisis de expresión génica mediante el método qPCR en tiempo real. Los resultados arrojados indican que generan respuestas génicas en las cuatro accesiones de quinua y se produce la expresión de los genes GST20 (Glutathione S-transferase), PCS1 (Phytochelatin synthase) y SODc (Superoxide dismutase), dando lugar a diferentes respuestas genéticas entre las variedades, al emplear 0.3 y 0.5 mM de arseniato y en los diferentes tiempos de estudio. Se concluye que la variedad V2 (Chaucha dulce) produce mayor respuesta génica cuando se coloca 0.5 mM de arseniato en el sustrato de cultivo y a un tiempo de 72 horas, los valores obtenidos fueron: para el gen GST20 un valor de expresión génica de 10.8848 ± 3.6953 ; para PCS1 un valor de 26.0439 ± 3.7342 y para el gen SODc 31.1608 ± 6.9151 .

Palabras claves: *Chenopodium quinoa*, estrés por arseniato, respuesta génica, gen GST20, gen PCS1, gen SODc.

SUMMARY

The discovery of the genome of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), has allowed research at the genetic level many metabolic functions including tolerance to different types of stress and their relationship at the metabolic level, from the identification of genes potentially involved in these processes. Therefore, the present study aimed to determine the stress caused by Arsenate applied at different concentrations [0.3 and 0.5 mM] that generated a response at the transcriptomic level to counteract such stress. The experiment was carried out in the greenhouse of the Laboratory of Vegetal Biotechnology of the Center of Agricultural Research of the Technical University of Ambato, where the vegetal material was cultivated under the following conditions: average internal temperature of 20°C and relative humidity of 50%. For this, germination trays with a mixture of sterile substrate, black soil and humus were used, and once the plants reached an appropriate foliar development (5 true leaves), they were submitted to stress by arsenate, to later collect them and carry out the respective analysis of gene expression. From the extraction of RNA from each sample, the cDNA was synthesized and then the gene expression analysis was performed using the qPCR in real time method. The results show that they generate genetic responses in the four accessions of quinoa and the expression of genes GST20 (Glutathione S-Transferase), PCS1 (Phytochelatin synthase) and SODc (Superoxide dismutase) is produced, giving rise to different genetic responses between varieties, using 0.3 and 0.5 mM of arsenate and at different times of study. It is concluded that variety V2 (Sweet Chaucha) produces greater gene response when 0.5 mM of arsenate is placed in the culture substrate and at a time of 72 h, the obtained values were: for gene GST20 with a gene expression value of $10,8848 \pm 3,6953$; for PCS1 a value of 26.0439 ± 3.7342 and for gene SODc 31.1608 ± 6.9151 .

Keywords: *Chenopodium quinoa*, arsenate stress, gene response, GST20 gene, PCS1 gene, SODc gene

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

Actualmente, existen pocas investigaciones relacionadas con el presente estudio, por lo que se tomaron antecedentes de investigaciones de distintos países, que presentan trabajos relacionados con la quinua u otras plantas; a continuación, se citan algunos de los estudios realizados:

Vatamaniuk *et al.* (1999) en sus investigaciones mencionan que los metales pesados se clasifican en esenciales y no esenciales. Los metales esenciales, como el Cu y el Zn suelen ser necesarios como cofactores en las relaciones redox así como en la ionización de agua durante la biocatálisis, pero tanto esenciales como no esenciales los metales pesados son un problema en las plantas ya que alteran su metabolismo cuando están en concentraciones desbalanceadas. A pesar de que las fitoquelatinas (PCs) son importantes en la tolerancia a metales pesados, la identidad molecular de las enzimas que sintetizan estos péptidos es aún desconocidas. Investigaciones realizadas con anterioridad no han sido capaces de identificar o aislar la fracción de proteína o gen que sintetiza las PCs. En este trabajo se aisló el gen de *Arabidopsis* (*AtPCSI*) que codifica una proteína cuya expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, y le confiere tolerancia a metales pesados al promover la acumulación de PCs dependiente del Cd^{2+} . Demostrando de esta manera que *AtPCSI* agrupa una sola especie de polipéptidos, suficientes para la síntesis de PCs activadas por Cd^{2+} a partir de glutatión (GHS) en condiciones *in vitro* en plantas y hongos, esto facilita la realización de estudios cristalográficos y mecánicos detallados de esta enzima y la fácil producción de PCs *in vitro* en una escala de mg/g.

Schmöger *et al.* (2000) realizaron un estudio en el que determinaron la presencia de Arsénico y sus aniones, la forma en que inducen la biosíntesis de fitoquelatinas (PCs)

([γ -glutamate-cysteine]_n-glycine), esto se ha observado en plántulas de *Arabidopsis*, en suspensiones celulares de *Rauwolfia serpentina* y en preparaciones enzimáticas de *Silene vilgaris*. Descubrieron que la activación enzimática y un posterior secuestro del As se dan por parte de las PCs formadas, esto se determinó mediante el análisis de espectroscopia de la masa de ionización del electrospray (ESI-MS) y estudios de filtración en gel de extractos libres de células, donde la fracción de PCs evaluada contenía cantidades importantes de As, mientras que el uso del inhibidor BSO (Buthionine sulfoximine) revelaron un nivel muy reducido de PCs y cantidades no detectables de As. Este trabajo favorece el argumento de la desintoxicación del metal por parte de los péptidos PC durante la intoxicación por arsénico.

Sappl *et al.* (2004) en su análisis proteómico de Glutathion S-Transferasas al aplicar 0.001-1 mM de ácido salicílico (SA) en cultivos celulares de *Arabidopsis* obtuvo como resultados que los GST muestran perfiles de inducción y expresión dependientes de dicha concentración, miembros que aunque comparten dosis de SA similares muestran diferencias en el momento de inducción del gen GST, otro detalle es que miembros relacionados pueden regularse en términos de niveles de expresión y magnitud de inducción. Para el año 2009, Sappl *et al.* ratifican que la respuesta al estrés transcripcional primario tiene un enfoque en cambios tempranos en la expresión génica y que los genes GST son específicos en sus patrones de inducción especialmente en protección contra estrés oxidativo.

Moons (2005) en su estudio sobre las interacciones reguladoras y funcionales de reguladores de crecimiento y Glutathion S-transferasas de las plantas, expone que las GST son proteínas multifuncionales inducidas por estímulos bióticos u abióticos, y llevan a cabo funciones catalíticas como la desintoxicación metabólica de herbicidas, eliminación de hidroperóxidos orgánicos tóxicos y protección de daño oxidativo; además, cumplen funciones no enzimáticas fundamentales como ser proteínas de unión para fitohormonas, regulan la apoptosis y están involucradas en la señalización de diversos tipos de estrés.

En el estudio de Gasic *et al.* (2007) tuvieron como objetivo desarrollar plantas transgénicas de *Brassica juncea* (mostaza india) con mayor tolerancia y acumulación de metales pesados y metaloides presentes en el suelo, específicamente de cadmio (Cd) y arsénico (As) mediante la utilización del gen *AtPCSI* que codifica la fitoquelatina (PCs) y se expresa en plantas de *Arabidopsis thaliana*. El segmento de gDNA *AtPCSI* se expresa en *Brassica juncea*, esta línea transgénica ha sido comparada con especies silvestres para la tolerancia y acumulación de Cd y As, las plantas transgénicas presentaron una tolerancia significativamente mayor a las silvestres. La expresión de *AtPCSI* en plantas transgénicas de *Brassica juncea* también resultó en una mayor tolerancia a niveles más altos de As, y acumularon pesos en fresco más altos que las plantas silvestres.

Abercrombie *et al.* (2008) mencionaron que el As es tóxico para las plantas, en su estudio usaron microarrays de oligonucleótidos de genoma entero para investigar las respuestas transcripcionales al estrés por arseniato en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Se dedujo que los genes relacionados con antioxidantes desempeñan un papel significativo en respuesta al estrés por el metal pesado en estudio. Se reveló la inducción de ciertas enzimas tales como la Cu/Zn SOD, así como chaperona de Cu SOD. En cambio, en respuesta al estrés por arseniato los Fe SODs fueron reprimidos fuertemente. Luego de haber realizado ensayos de actividad qRT-PCR y SOD, y ejecutado los análisis estadísticos de productos de rango no paramétrico para detectar genes de expresión diferencial, se estableció que el estrés por arseniato afecta la expresión de varios genes con funciones biológicas desconocidas o escasas.

Yadav (2010) en su trabajo sobre la toxicidad en plantas dio a conocer que, al exponerse a metales pesados, las plantas experimentan estrés oxidativo generándose daños celulares para reducir estos efectos perjudiciales desarrollaron mecanismos de desintoxicación, entre estos esta la quelación y la compartimentación subcelular. En la quelación las plantas utilizan fitoquelatinas (PCs) que son péptidos sintetizados a partir de un glutatión reducido (GHS), las PCs forman un complejo con iones metálicos y los secuestran en la vacuola. Adicionalmente, señalan que existen especies de plantas

naturales que acumulan metales pesados, por lo que se podría manipular genéticamente cultivos agrícolas para obtener variedades transgénicas tolerantes o resistentes a este tipo de estrés.

Paulose *et al.* (2010) evaluaron genes y redes de genes implicados en el metabolismo y la desintoxicación del Arsénico en *Crambe abyssinica* (mostaza abisinia), un cultivo no alimenticio tolerante a los metales pesados. Se ha detectado que este cultivo acumula niveles altos de As por lo que sería ideal para la fitorremediación en suelos con presencia de metales pesados y metaloides. Para la identificación de las transcripciones expresadas diferencialmente y las vías involucradas en el metabolismo y la desintoxicación del As, las plantas de *Crambe abyssinica* fueron sometidas a estrés por arseniato por un periodo de diez días y a diferentes concentraciones [0 a 350 μM] y se utilizó un enfoque de PCR-SSH (Select Suppression Substraction Hybridization). De los tratamientos realizados observaron que a una concentración baja de arseniato [100 a 150 μM], los efectos no son tan notorios en cuanto a peso o en la morfología de la planta, a medida que la concentración aumenta los efectos del estrés se hacen visibles ya que a una dosificación moderada [200 a 350 μM] el peso de las plantas disminuyó, aunque no existe daño celular agudo. Por otro lado, al someter a las plantas a concentraciones altas [300 a 350 μM], estas fueron afectadas gravemente quedando raquílicas, con peso reducido y lesiones en las hojas. Molecularmente, se secuenciaron 105 cDNAs los cuales representaban a 38 genes, mismos que codifican proteínas que tienen funciones como antioxidantes, transportadores de metales, reductasas y enzimas involucradas en el proceso de degradación de proteínas. Las transcripciones correspondientes a los cDNAs sustraídos mostraron un fuerte aumento de la regulación por estrés de As, por lo que podrían ser utilizados como marcadores, permitiendo desarrollar estrategias de fitorremediación o para la ingeniería de cultivos tolerantes.

Morillo *et al.* (2017) argumentan que la quinua es una especie altamente tolerante a diferentes tipos de estrés como salinidad, frío, temperaturas de congelamiento en la noche, alta radiación solar, además tolera factores fitosanitarios, características que han sido resultado de un largo proceso de domesticación y una alta variabilidad genética. A partir de esto investigaron la caracterización de la diversidad genética de una colección de 55 materiales genéticos de quinua con siete marcadores

microsatélites RAMs, esto debido a que se trata de un cultivo con amplia capacidad de adaptación agroecológica. Luego de los análisis moleculares del material genético, mediante el coeficiente de Nei-Li a una similitud de 0.65 se separó dichos materiales en cuatro grupos, el grupo I tiene una distancia genética de 0.8 a 0.92 esto muestra que son materiales altamente homogéneos y han perdido su diversidad genética debido a procesos de domesticación muy elevados, el grupo II a 0.60 de similitud se encuentra a una distancia genética de 0.91 con respecto al grupo I mostrando un alto grado de parentesco, los grupos III y IV presentaron distancia genéticas de 0.80 habiendo un mayor flujo genético. Con respecto a la caracterización de la diversidad genética con marcadores moleculares reveló que los 55 materiales genéticos en estudio son muy homogéneos debido a que encontraron una mayor cantidad de individuos homocigotos por su gran porcentaje de autofecundación.

Scoccianti *et al.* (2016) en su estudio sobre el estrés oxidativo y las respuestas antioxidantes de quinua frente Cromo (III) mencionan que este cultivo presenta alta resistencia al estrés abiótico, evaluaron los ajustes metabólicos que ocurren en esta planta al exponerse a diferentes concentraciones [0.01-5 mM] de CrCl₃, para esto utilizaron plantas jóvenes bajo cultivo hidropónico, apreciando tres y/o siete días después del tratamiento la absorción de Cr, el crecimiento, el estrés oxidativo y otros parámetros bioquímicos. Las hojas habían acumulado menos Cr, las raíces y tallos tenían mayor cantidad de este metal, la cantidad de pigmentos fotosintéticos se vio reducida a dosis más altas de Cr, los niveles de peroxidación de lípidos, peróxido de hidrógeno y prolina aumentaron a 5 mM de Cr (III). En conclusión, manifestaron que esta planta tiene mayor tolerancia a 1 mM de Cr (III), pero a medida que las concentraciones se elevan existe estrés oxidativo.

1.2 Categorías Fundamentales o Marco Conceptual

1.2.1 Variable independiente: Estrés por arseniato

El arsénico es un metal pesado que se encuentra en la naturaleza y de manera particular en los suelos, su toxicidad depende de la concentración y disponibilidad relacionadas con el pH, solubilidad, salinidad y temperatura del suelo. Este metal llega al suelo de diferentes maneras ya sea por medio del agua de riego agrícola, uso de pesticidas contaminantes en actividades agrícolas, además se menciona que la ceniza emanada durante la actividad volcánica aporta cantidades importantes de ciertos metales contaminantes que se acumulan en el suelo. Otros factores importantes de contaminación arsenical en los suelos son por emisiones de zonas industriales, residuos mineros y derivados de combustibles, pinturas, abonos, aguas residuales y factores atmosféricos (Cabezas *et al.*, 2004; Wuana *et al.*, 2011; Mancilla *et al.*, 2012; y Fiallos, 2017).

Garg *et al.* (2011) y Finnegan *et al.* (2012) en sus investigaciones señalan que el Arsénico altera las propiedades fisicoquímicas y deteriora la fertilidad de los suelos, además de causar daños en los cultivos, hay dos formas de As inorgánico que son fácilmente absorbidas por las células radiculares de una planta, el arsenito (AsIII) y el arseniato (AsV). Cuando no existe una desintoxicación de As en las plantas, se desencadenan una serie de reacciones que impiden el crecimiento, interrumpen los sistemas fotosintético y respiratorio, y estimulan el metabolismo secundario. A esto las plantas han desarrollado respuestas que incluyen la hiperacumulación, el sistema de defensa antioxidante y la fitoquelación.

Tripathi *et al.* (2012) determinaron que el Arsénico es un contaminante del agua potable y del agua subterránea que generalmente son utilizadas para el riego, llegando así a la cadena alimenticia y constituyendo un riesgo grave para la salud de la población en el mundo. El análisis del transcriptoma, proteoma y metaboloma de cualquier organismo muestra las actividades biológicas en un momento dado que son las

responsables de su adaptación a condiciones ambientales que lo rodean, estos tres aspectos pueden ser alterados durante la exposición a As. De esto se dedujo que existen proteínas traducidas de las plantas a nivel proteómico y metabólico que las hacen resistentes o tolerantes al As, suele existir también expresión o inhibición de algunos genes de importancia que están relacionados al estrés por metales pesados.

Islam *et al.* (2015) señalan que las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos debido a cambios que afectan su crecimiento y desarrollo, la contaminación por metales pesados es uno de los factores de estrés abiótico, esta contaminación se da por causas antropogénicas o naturales conduciendo a una mayor toxicidad y a su acumulación en las plantas. Estos autores determinaron que la contaminación por Arsénico afecta el desempeño de las plantas y estas a su vez utilizan mecanismos de tolerancia como la fitoquelación, el secuestro de vacuolas y la activación de sistemas antioxidantes. Aparte de esto, existen mecanismos de señalización que se activan en las plantas y que involucran el uso de proteínas, iones de calcio, hormonas, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, facilitando la supervivencia de las plantas bajo estrés de arsénico al activar su sistema de defensa.

1.2.2 Variable dependiente: Expresión génica de la quinua

Tapia (2014) y otras investigaciones realizadas por IICA (2015) mencionan que el cultivo de la quinua es conocido por su alta biodiversidad genética y su potencial de adaptación a diferentes características ambientales. Además, ha sido considerado como un cultivo importante para la lucha contra el hambre a nivel mundial, esto se debe a su contenido nutricional, a la plasticidad genética que posee, su tolerancia a suelos salinos, resistencia a temperaturas extremas y a la poca disponibilidad de agua.

La secuencia completa del genoma de la quinua ha permitido buscar, identificar y seleccionar variantes de genes con un alto interés agronómico, por lo que se ha avanzado en el mejoramiento de múltiples atributos (Jarvis *et al.*, 2017). Con esto se

podría realizar mejoramientos a nivel genético de este cultivo, un avance importante sería generar variedades o genotipos que sean resistentes a distintos tipos de estrés, permitiendo extender el cultivo a nuevas zonas de producción (Repetto, 2017).

Gen constitutivo: Eisenberg *et al.* (2013) y Hounkpe *et al.* (2020) coinciden en que se trata de genes que se expresan a un nivel comparativamente bajo con respecto a otros genes de las células, además son necesarios para el mantenimiento de las funciones celulares básicas. Son importantes para la calibración de la expresión génica por lo que los genes housekeeping son utilizados en experimentos de PCR a tiempo real (real time), sirviendo de control positivo.

Maturase K (matK): Yu *et al.* (2011) mencionan que este es un gen plastidial de las plantas, en las angiospermas es uno de los genes codificantes más variables por lo que se lo utiliza como un “código de barras” para estudios génicos en las plantas.

Expresión del gen Glutathione S -transferase (GST): Nebert *et al.* (2004) en su investigación dan a conocer que la familia de genes que sintetizan las enzimas glutatión S -transferasas (GST) intervienen en ciertos procesos vitales, están presentes en los mecanismos de toxificación y desintoxicación, esto se da mediante la unión de glutatión reducido (GSH) con productos químicos extraños, productos farmacéuticos, contaminantes ambientales, esto lleva a una mayor protección de las célula contra el daño de factores adversos.

Expresión del gen Phytochelatin synthase (PCS): La fitoquelatina sintasa (PCS) es activada por iones de metales pesados y se ve involucrada en la síntesis de fitoquelatinas partir de glutatión (GSH), las PC son péptidos vegetales que se unen a metales pesados. En las plantas los iones de metales pesados forman complejos como tiolatos con fitoquelatinas (PC) (Blum *et al.*, 2007; Filiz *et al.*, 2019; e InterPro, 2020).

Expresión del gen Superoxide dismutase (SOD): La enzima Superóxido dismutasa (SOD) lleva a cabo la dismutación de los radicales O_2^- a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. En las plantas esta enzima juega un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo, llegando a demostrarse que en algunas plantas transgénicas la modificación en la expresión del gen que sintetiza SOD mejora notablemente la tolerancia a dicho estrés (Monk *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 2004; Machín *et al.*, 2017; y Rodas, 2020).

1.2.3 Unidad de análisis: Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

1.2.3.1 Centro de origen y domesticación

Mujica *et al.* (2001) y Moreno (2016) dan a conocer que la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un pseudocereal originario de los Andes y su centro de origen se halla en los valles de la Zona Andina a los alrededores del lago Titicaca, zona donde se encuentra la mayor diversidad genotípica y de progenitores silvestres de esta planta.

Por otro lado, González (2009) y Mina (2014) determinan que el origen genético de este cultivo se dio por el cruce de dos especies diploides diferentes ($2n=18$ cromosomas), por lo que viene a ser un cultivo tetraploide ($2n=4x=36$ cromosomas). Hasta la fecha aún no se han podido identificar las dos especies parentales de la quinoa, pero se argumenta que se encuentran entre las especies silvestres o que ya no existen.

Varias investigaciones mencionan que esta planta se ha venido cultivando desde hace más de 7000 años por culturas preincaicas e incaicas y que su domesticación se dio en regiones de Bolivia, Perú y Ecuador, hace unos 3000 a 5000 años aproximadamente; es considerado hasta la actualidad como un alimento altamente nutritivo y de consumo básico de muchas poblaciones andinas (Jacobsen *et al.*, 2002; Esprella, 2011; y SESAN, 2013).

1.2.3.2 Clasificación taxonómica

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua

| Taxón | Denominación |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Caryophyllales |
| Familia: | Amaranthaceae |
| Subfamilia: | Chenopodioideae |
| Tribu: | Chenopodieae |
| Género: | <i>Chenopodium</i> |
| Especie: | <i>quinoa</i> |
| Nombre Binomial: | <i>Chenopodium quinoa</i> WILLD. |
| Nombre Común: | Quinoa, quínoa, kinoa, kiuna, parca |

Fuente: Adaptado de Esprella (2011), Tropicos.org (2020)

1.2.3.3 Descripción botánica y morfológica



Gráfico 1. Planta de quinua

A continuación, se indica la descripción botánica y morfológica de la quinua:

Tabla 2. Descripción botánica y morfológica de la quinua

| Parte | Características |
|------------------------|---|
| Planta: | Es una herbácea anual, dicotiledónea, crece hasta una altura de 2 a 3 m. Su fenología, morfología y coloración dependerá mucho de las condiciones agroecológicas en que se desarrolla el cultivo y también del genotipo. En lo que se refiere a la coloración hay varios genotipos que presentan colores que van desde verde, naranja, morado a rojo, la morfología es variada y las etapas fenológicas van de 90 a 240 días. |
| Raíz: | Es pivotante, suele alcanzar profundidades variables, presenta muchas ramificaciones y es fibrosa; el crecimiento y desarrollo de la raíz es dependiente del genotipo, la nutrición de la planta, el tipo de suelo en que se establece, además de otros factores. |
| Tallo: | Es cilíndrico en el cuello de la planta mientras que se torna angular desde las ramificaciones, su epidermis es cutinizada y presenta variados colores, el diámetro y la altura del tallo es variable ya que está influenciado por factores como el genotipo, distancias de siembra, condiciones generales del cultivo, entre otros. |
| Hojas | Las hojas son alternas y pueden presentar diversas formas, suelen ser grandes, triangulares, romboidales o lanceoladas. Son carnosas y están cubiertas por gránulos o cristales de oxalato de calcio que absorben agua del medio ambiente manteniendo la humedad relativa que rodea la hoja. La coloración de las hojas es verde o varía entre tonos púrpura, rojas, rosadas, amarillas o naranjas. |
| Flores | Son sésiles, incompletas, pequeñas y no poseen pétalos, varios autores corroboran que una misma planta presenta hasta tres clases de flores: las hermafroditas (estambre y pistilo), las pistiladas (flores femeninas) y las androestériles (estambre y pistilo estériles), planta autógama con un estimado de 17% de polinización cruzada. |
| Inflorescencia: | Es de tipo panoja, formada por un eje central donde se desarrollan ramificaciones secundarias y terciarias. El tamaño de la panoja es variable, puede alcanzar una longitud de 30 a 80 cm con un diámetro de 5 a 30 cm. Dependiendo de la posición y forma de los glomérulos (agrupación de flores) se clasifican en tres grupos: amarantiformes (los glomérulos se ubican en las ramificaciones secundarias y tienen forma casi rectangular), glomeruladas (los glomérulos se ubican en las ramificaciones terciarias y son casi redondeados) e intermedias (glomérulos sin una forma definida). |
| Fruto: | Es un aquenio, el perigonio tiene forma de estrella y encierra una sola semilla dejándola caer al alcanzar la madurez. Suele ser redondo, de coloración variable y posee saponina. |
| Semilla: | El fruto una vez llegado a su madurez, tiene forma elipsoidal, lenticular, esferoidal o cónica, su tamaño varía entre los 1.8 a 2.6 mm con un diámetro aproximado de 2 mm y un espesor de 1 mm. Tiene tres partes: la episperma (saponina); el embrión (radícula y dos cotiledones); y el perisperma (granos de almidón). |

Fuente: Arenas *et al.* (2017), Calla (2012), Costa (2014), González (2009), Gómez (2016), Moreno (2016), SESAN (2013), Sánchez (2013) y Ramírez *et al.* (2016)

1.2.3.4 Valor nutricional de la quinua

En un boletín presentado por León-Lobos *et al.* (2015) en Chile, mencionaron que la quinua posee un alto valor nutricional atribuyéndole muchas bondades peculiares, contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales para el ser humano, además de ser una excelente fuente de minerales, vitaminas, fibra dietaria, antioxidantes, entre otros. Razones como estas hacen de la quinua sea un alimento nutricionalmente bien balanceado, atribuyéndole propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomodulatorias y anticarcinogénicas. La FAO (2019) cita que el contenido de nutrientes de la quinua es el mencionado a continuación:

Tabla 3. Propiedades nutricionales de la quinua

| Nutriente | Unidad | Valor por 100 g |
|------------------------------|---------------|------------------------|
| Energía | Kcal | 368.00 |
| Agua | g | 13.28 |
| Almidón | g | 52.22 |
| Carbohidratos por diferencia | g | 64.16 |
| Cenizas | g | 2.38 |
| Fibra dietaria total | g | 7.00 |
| Lípidos totales (grasas) | g | 6.07 |
| Proteína | g | 14.12 |
| Calcio, Ca | mg | 47.00 |
| Cobre, Cu | mg | 0.59 |
| Fosforo, P | mg | 457.00 |
| Hierro, Fe | mg | 4.57 |
| Magnesio, Mg | mg | 197.00 |
| Manganeso, Mn | mg | 2033.00 |
| Potasio, K | mg | 563.00 |
| Sodio, Na | mg | 5.00 |
| Zinc, Zn | mg | 3.10 |
| Selenio, Se | µg | 8.50 |

Fuente: FAO (2019)

1.2.3.5 Características de adaptabilidad de la quinua

Se ha catalogado a la quinua como un vegetal altamente resistente a factores desfavorables, se adapta a condiciones de sequía, heladas, salinidad, factores bióticos y componentes presentes en el suelo (Apaza *et al.*, 2013). La resistencia a la salinidad, a las heladas y la tolerancia a la sequía fueron heredadas de especies antecesoras como *C. carnosulum*, *C. pallidicaule*, y *C. petiolare* respectivamente, esto debido a un proceso evolutivo donde hubo cruzamiento entre estas especies. En algunas zonas se han reportado especies que son resistentes al mildiu (Gabriel *et al.*, 2012), luego de varias investigaciones se ha demostrado que esta planta desarrolla mecanismos de adaptación a la sequía mediante el uso eficiente del agua (Bosque *et al.*, 2000; y Arenas *et al.*, 2017).

1.2.3.6 Producción de quinua en el Ecuador

Actualmente este cultivo ha ido tomando auge por lo que ha dejado de ser catalogado como secundario, su producción se ubica casi junto a los páramos de la sierra ecuatoriana con mayor frecuencia en las provincias de Chimborazo, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Pichincha y Carchi (Cazar *et al.*, 2004; y Mina, 2014). Algunos datos estadísticos afirman que Ecuador el año 2010 tuvo una producción anual de 840 toneladas en promedio por lo que está en el tercer lugar entre los países productores de quinua en la zona andina, luego de Perú y Bolivia (Moreno, 2016).

La producción de quinua en nuestro país se ha visto afectada por diversos factores, entre estos los más importantes son la baja de precios en el mercado nacional e internacional además de la alta competencia de precios tanto con la producción de Perú como de Bolivia. Para 2016, a pesar de que el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) dotó de semillas certificadas y kits de insumos a los productores la superficie sembrada fue de solamente 7886 hectáreas mientras que la meta nacional era de 10000 hectáreas (Líderes, 2018).

Peralta *et al.* (2008) y Tapia (2014) mencionan que se han incrementado los mercados de consumo de la quinua ecuatoriana de producción orgánica certificada, convencional o agroecológica de variedades mejoradas o nativas. Entre los mercados de exportación más representativos están Estados Unidos, países de la Unión Europea y Asia.

1.2.3.7 Variedades de quinua en el Ecuador

De acuerdo a Cazar (2004), alrededor del mundo se cultivan unas 70 variedades de quinua, tanto nativas como mejoradas, Mujica (1995) y Peralta *et al.* (2008) ratifican que las principales variedades que se cultivan en nuestro país son las siguientes:

- a) **Tunkahuán:** Variedad semitardía originaria de Carchi y su ciclo de cultivo varía entre los 150 a 170 días, su contenido de saponina es de 0.06% y de proteína es de 15.73%, su rendimiento es alto con 2200 kg/ha.
- b) **Pata de Venado o Taruka chaki:** Variedad precoz con un ciclo de 130 a 150 días, tiene 0.05% de saponina y un rendimiento promedio de 1400 kg/ha.
- c) **Chaucha:** Dulce y amarga, tienen un ciclo vegetativo que comprende entre los 105 a 135 días, su contenido de saponina es bajo. Estas variedades han sido cultivadas por años en localidades de Tungurahua y Pichincha.
- d) **Cochasquí:** Variedad tardía de 160 a 220 días de ciclo vegetativo, su contenido de saponina es elevado ya que posee 4% y un 16.5% de proteína, su rendimiento oscila entre los 1000 a 4000 kg/ha, este valor dependerá de las características en que se desarrolle.
- e) **Imbaya:** Originaria de Imbabura, variedad semitardía con un ciclo de 145 a 180 días, el contenido de saponina es menor al 4% y mientras que tiene un 19.7% de proteína, con rendimientos de 1000 a 3000 kg/ha.

- f) **Ingapirca:** Esta variedad fue recolectada en Perú, variedad semiprecoz con 160 días de ciclo, es tolerante a la sequía y tiene un contenido de saponina de 0.07% y 15.97% de proteína, su rendimiento oscila los 1550 kg/ha.

1.2.3.8 Condiciones agroclimáticas para el cultivo

Algunos de los requerimientos del cultivo son los mencionados a continuación:

Tabla 4. Condiciones agroclimáticas para el cultivo

| Requerimiento | Detalles |
|----------------------|--|
| Suelo: | Prefiere un suelo franco, con buen drenaje y alto contenido de materia orgánica, pendientes moderadas y un contenido medio de nutrientes, es exigente en N y Ca además de P y K. |
| pH del suelo: | Puede crecer en suelos altamente alcalinos (9 de pH) hasta en extremo ácidos (4.5 de pH), pero se ha determinado que un crecimiento óptimo se da a un pH de 5.3 a 7. |
| Clima: | Se adapta a diferentes climas, climas que están desde la orilla del mar, pasando por los valles andinos llegando hasta zonas cercanas al paramo. |
| Agua: | Prospera con precipitaciones de 500 a 800 mm durante el ciclo, esto varía de acuerdo a cada variedad cultivada. |
| Temperatura: | La temperatura media optima esta entre los 15 a 20°C, aunque logra soportar temperaturas extremas de hasta -8°C y 38 °C. |
| Radiación: | Soporta radiaciones extremas de las zonas altas de los Andes (462 cal/cm2/día en Puno, Perú), favoreciendo una fotosíntesis intensa y una producción vegetal importante. |
| Fotoperiodo: | Requiere aproximadamente 12 horas luz/día, aunque hay variedades de días cortos y largos. |
| Altitud: | En la serranía ecuatoriana este cultivo se desarrolla a una altitud de 2000 a 3800 msnm. |

Fuente: Adaptado de Mujica *et al.* (2004), Peralta (2009), SESAN (2013), Simancas *et al.* (2015) y Gómez *et al.* (2016)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Analizar la expresión génica de cuatro accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) bajo condiciones de estrés por arseniato.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar los genes responsables que activan rutas metabólicas para el estrés causado en la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) por Arseniato mediante herramientas bioinformáticas.
- Evaluar la expresión génica de cuatro accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) mediante el método de qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).
- Identificar la accesión de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) que presenta mayor respuesta génica al estrés causado por el Arseniato a las diferentes concentraciones estudiadas [0.3 y 0.5 mM].

1.4 Hipótesis

El estrés ocasionado por Arseniato aplicado a diferentes concentraciones [0.3 y 0.5 mM] generan una respuesta génica en referencia al gen constitutivo en las cuatro accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Equipos y Materiales

2.1.1 Equipos

- Amalgamador
- Balanza electrónica
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Congelador
- Equipo de electroforesis
- Micro centrífuga
- Nanodrop
- PCR cuantitativa (qPCR tiempo real)
- Tanque de nitrógeno líquido
- Termoblock
- Timer
- Termohigrómetro
- Vortex genie 2 con adaptador

2.1.2 Materiales

- Bandejas de siembra
- Espátulas y pinzas metálicas
- Fertilizante Hakaphos Violeta (13-40-13)
- Frascos de vidrio
- Fundas herméticas de plástico
- Guantes, mascarillas, gafas, mandil.
- Material vegetal: cuatro accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

- Paletas de identificación
- Papel de aluminio
- Piceta
- Pipetas y micropipetas
- Plástico sellador
- Probeta
- Puntas para pipetas y micropipetas (con y sin filtro)
- Sustrato a base de turba y perlita, tierra negra y humus
- Tubos de PCR
- Vasos de precipitación

2.1.3 Reactivos

- Agua DEPC
- Agua destilada esterilizada
- Arseniato Dibásico de Sodio Heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Buffer de extracción
- Buffer TAE 1X
- Cloroformo
- Dinucleótidos (dNTPs)
- Etanol
- Isopropanol
- Kit de síntesis de cDNA
- Poliacrilamida
- Primers para qPCR (Forward and reverse primers)
- Racks para PCR
- Racks para tubos de 1.1 ml y 2.2 ml
- RNAsa
- Solución cloroformo-alcohol
- Solución de Trizol
- Taq DNA polimerasa

2.2 Métodos

2.2.1 Ubicación del Experimento

El ensayo se efectuó en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, sus coordenadas geográficas obtenidas mediante GPS son 01°22'02" de latitud Sur y 78°36'20" de longitud Oeste, se encuentra a 2865 msnm.

2.2.2 Características del Lugar

2.2.2.1 Ambiente

El invernadero en donde se desarrolló la investigación presentó una temperatura interna media de 20°C, con temperaturas máximas de 27°C y mínimas de 15°C, la humedad relativa de 50%, datos que fueron tomados con un Termohigrómetro.

2.2.2.2 Sustrato

Se utilizó sustrato compuesto por turba y perlita, este sustrato se mezcló con tierra negra y humus.

2.2.3 Factores en Estudio

A. Accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

| | |
|-----------|----------------|
| V1 | Tunkahuan |
| V2 | Chaucha dulce |
| V3 | Chaucha amarga |
| V4 | Pata de Venado |

B. Dosis de arseniato a aplicarse

| | |
|-----------|--------|
| D1 | 0.3 mM |
| D2 | 0.5 mM |

C. Tiempo de recolección de las muestras

| | |
|-----------|-----------|
| H1 | 12 horas |
| H2 | 24 horas |
| H3 | 48 horas |
| H4 | 72 horas |
| H5 | 168 horas |

2.2.4 Diseño Experimental

Para el análisis estadístico e interpretación de los datos se utilizó el diseño experimental de bloques al azar en arreglo factorial $4 \times 2 \times 5 + 4$, con dos réplicas donde se incluye un Control (C) para cada accesión de quinua en Tiempo cero (H0).

2.2.5 Tratamientos

Los tratamientos constituyen la combinación de los factores en estudio y fueron los siguientes:

Tabla 5. Tratamientos del estudio

| Tratamiento | Variedad (V) | Dosis (D) | Tiempo (H) | Codificación |
|--------------------|---------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| C1 | 1 | 0 | 0 | V1C1H0 |
| C2 | 2 | 0 | 0 | V2C1H0 |
| C3 | 3 | 0 | 0 | V3C1H0 |
| C4 | 4 | 0 | 0 | V4C1H0 |
| T1 | 1 | 1 | 12 | V1D1H1 |
| T2 | 2 | 1 | 12 | V2D1H1 |
| T3 | 3 | 1 | 12 | V3D1H1 |
| T4 | 4 | 1 | 12 | V4D1H1 |
| T5 | 1 | 2 | 12 | V1D2H1 |
| T6 | 2 | 2 | 12 | V2D2H1 |
| T7 | 3 | 2 | 12 | V3D2H1 |
| T8 | 4 | 2 | 12 | V4D2H1 |
| T9 | 1 | 1 | 24 | V1D1H2 |
| T10 | 2 | 1 | 24 | V2D1H2 |
| T11 | 3 | 1 | 24 | V3D1H2 |
| T12 | 4 | 1 | 24 | V4D1H2 |
| T13 | 1 | 2 | 24 | V1D2H2 |
| T14 | 2 | 2 | 24 | V2D2H2 |
| T15 | 3 | 2 | 24 | V3D2H2 |
| T16 | 4 | 2 | 24 | V4D2H2 |
| T17 | 1 | 1 | 48 | V1D1H3 |
| T18 | 2 | 1 | 48 | V2D1H3 |
| T19 | 3 | 1 | 48 | V3D1H3 |
| T20 | 4 | 1 | 48 | V4D1H3 |
| T21 | 1 | 2 | 48 | V1D2H3 |
| T22 | 2 | 2 | 48 | V2D2H3 |
| T23 | 3 | 2 | 48 | V3D2H3 |
| T24 | 4 | 2 | 48 | V4D2H3 |
| T25 | 1 | 1 | 72 | V1D1H4 |
| T26 | 2 | 1 | 72 | V2D1H4 |
| T27 | 3 | 1 | 72 | V3D1H4 |
| T28 | 4 | 1 | 72 | V4D1H4 |
| T29 | 1 | 2 | 72 | V1D2H4 |
| T30 | 2 | 2 | 72 | V2D2H4 |
| T31 | 3 | 2 | 72 | V3D2H4 |
| T32 | 4 | 2 | 72 | V4D2H4 |
| T33 | 1 | 1 | 168 | V1D1H5 |
| T34 | 2 | 1 | 168 | V2D1H5 |
| T35 | 3 | 1 | 168 | V3D1H5 |
| T36 | 4 | 1 | 168 | V4D1H5 |
| T37 | 1 | 2 | 168 | V1D2H5 |
| T38 | 2 | 2 | 168 | V2D2H5 |
| T39 | 3 | 2 | 168 | V3D2H5 |
| T40 | 4 | 2 | 168 | V4D2H5 |

2.2.6 Procesamiento de la Información

Los datos obtenidos en el equipo de PCR cuantitativa (qPCR tiempo real) fueron importados a EXCEL, se utilizaron diferentes ecuaciones para el cálculo de la

expresión de cada uno de los tres genes de estudio, una vez calculada dicha expresión génica se elaboraron tablas y gráficos, con sus respectivas medias y desviación estándar. Además, se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I con el fin de realizar los análisis estadísticos.

2.2.7 Manejo del experimento

- a. Se prepararon sustratos en el que se sembraron semillas de quinua (de 3 a 4 semillas por pilón), para esto se realizó una mezcla en proporciones 1:1:1 que corresponde a 1 kg de tierra negra, 1 kg de humus y 1 kg de sustrato estéril.
- b. Las distancias de siembra fueron de 3 x 3 cm. Se efectuó una fertilización completa con Hakaphos Violeta (13 - 40 - 13) en todos los tratamientos a una dosis recomendada de 0.5 g/L.
- c. Se realizaron riegos periódicos (por dos veces al día: a las 7:30 de la mañana y a las 16:00 de la tarde) en las bandejas de germinación evitando la deshidratación excesiva de los pilones en que se encuentran las plántulas.
- d. La toma de muestras se realizó al mes luego de la siembra y germinación de las plántulas de quinua, al presentarse más o menos 5 hojas verdaderas.
- e. De las bandejas donde se encontraban las plántulas de quinua se las retiró cuidadosamente.
- f. Cada muestra consistió entre 3 y 5 plántulas, que fueron lavadas con agua destilada removiendo el sustrato de las raíces y quitando las impurezas de las hojas.
- g. Estas muestras fueron colocadas en envolturas de papel aluminio con su respectiva codificación y posterior a esto se guardaron en fundas herméticas.
- h. Las fundas que contenían las muestras vegetales se almacenaron en refrigeración a -20°C, evitando de esta manera su deterioro hasta la extracción de ARN.

2.2.8 Extracción de ARN de las muestras a analizar

Para la extracción de ARN de las muestras se procedió de acuerdo con el protocolo presentado a continuación:

- a. 100 mg de material congelado fue homogenizado en un amalgamador con perlas de vidrio en tubos de microcentrífuga, por un tiempo de 10 segundos.
- b. Posteriormente se adicionó Trizol, con este reactivo se logró precipitar el ARN de cada muestra.
- c. Luego se llevaron las muestras a la centrífuga para separar el material residual del ARN, y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo donde se le agregó cloroformo. La mezcla se centrifugó nuevamente, de esta manera se separó el sobrenadante o fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo donde se añadió isopropanol, agitando mediante vortex por 5 segundos.
- d. Una nueva centrifugación fue necesaria para descartar el sobrenadante, obteniendo un precipitado que será el ARN.
- e. Finalmente se diluyó el precipitado (ARN) en agua DEPC (libre de nucleasas y RNAsas) para luego ser utilizado en la síntesis de cDNA.

2.2.9 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se procedió, de acuerdo al protocolo presentado a continuación:

- a. Se preparó el primer de hibridación con los componentes presentados en la siguiente tabla:

Tabla 6. Componentes utilizados en la hibridación de ARN

| | |
|-------------------|--------|
| Oligo d(T) primer | 0.5 uL |
| dNTP mix | 0.5 uL |
| Plantilla ARN | 3.0 uL |
| Agua tratada DEPC | 2.5 uL |

- b. Posteriormente se llevó a incubación a 65°C durante 5 minutos y luego se añadió lo siguiente:

Tabla 7. Componentes utilizados en la transcripción de ARN

| | |
|---------------------------------|--------|
| 5x SSIV Buffer | 2.0 uL |
| DTT | 0.5 uL |
| Inhibidor de la Ribonucleasa | 0.5 uL |
| Solución de retro transcripción | 0.5 uL |

- c. Seguido, se incubaron las mezclas anteriores en baño María a 55°C por 10 minutos.
- d. Luego, se guardaron las muestras a -20°C para su posterior uso en la amplificación en el qPCR tiempo real.

2.2.10 Determinación de la calidad y concentración del ARN y cADN

La determinación de la pureza, y concentración del cADN y ARN se realizó mediante el uso del Nanodrop. La relación de lectura de absorbancia de A260/A280 proporciona un estimado de pureza. Una solución de ADN pura tiene una relación A260/A280 a razón de 1.7 a 1.9. Una relación inferior a 1.7 indica que pueden existir proteínas y otros elementos absorbentes de luz ultravioleta en la muestra, una relación superior a 1.9 indica que las muestras pueden estar contaminadas con fenol o cloroformo.

2.2.11 Análisis de expresión génica por qPCR

El método de análisis fue el de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Polymerase Chain Reaction, qPCR), esta técnica permite amplificar secuencias de DNA (Pérez de Castro, 2010).

Se utilizó PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix para las reacciones de qPCR, de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial (Applied Biosystems™, 2019) conjuntamente con los primers diseñados para la amplificación de los genes de interés más un gen de control (MatK) de expresión constitutiva, permitió determinar la expresión de los tres genes GST20, PCS1 Y SODc.

La empresa Applied Biosystems™, fabricante del equipo PCR tiempo real recomienda usar el siguiente protocolo:

1. Prepara lo necesario para las reacciones, más un 10% de exceso.

Tabla 8. Componentes de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

| Componente | Volumen (10 µL/tubo) | Volumen (10 µL/tubo) |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X) | 5 µL | 10 µL |
| Forward and reverse primers | Variable | Variable |
| DNA template + Nuclease-Free Water | Variable | variable |
| Total | 10 µL | 20 µL |

2. Se mezclaron bien los componentes, luego se centrifugó brevemente el contenido eliminando las burbujas de aire.
3. Se transfirió el contenido de cada reacción a los hoyos de la placa óptica, para luego sellar la placa con una cubierta adhesiva óptica y nuevamente se centrifugó el contenido.
4. Para la configuración del instrumento de PCR en tiempo real, primero colocamos la placa y cerramos la bandeja.
5. Configuramos las condiciones del ciclo térmico especificadas a continuación:

Tabla 9. Modo de ciclo estándar (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$)

| Paso | Temperatura | Duración | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|--------|
| Activación UDG | 50°C | 2 minutos | Hold |
| Dual-Lock™ DNA polymerase | 95°C | 2 minutos | Hold |
| Desnaturalizar | 95°C | 15 segundos | 40 |
| Recocer/extender | 60°C | 1 minuto | |

6. Configuramos el instrumento para el paso de la disociación:

Tabla 10. Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión)

| Paso | Ramp rate | Temperatura | Tiempo |
|------------------|----------------|-------------|-------------|
| 1 | 1.6°C/segundo | 95°C | 15 segundos |
| 2 | 1.6°C/segundo | 60°C | 1 minuto |
| 3 ^[1] | 0.15°C/segundo | 95°C | 15 segundos |

^[1] Disociación

7. Se configuró el volumen de reacción apropiado para la placa que se empleó en la investigación. Luego se ejecutó el instrumento, para luego revisar los gráficos de amplificación.
8. Los datos obtenidos fueron llevados a EXCEL para los cálculos necesarios en la determinación del grado de expresión de cada gen estudiado.

2.2.12 Variables Respuesta

Al realizar esta investigación se obtuvo el grado de expresión génica y la intervención en las rutas metabólicas que presentan los genes detallados a continuación:

Tabla 11. Genes a ser evaluados

| Gen | ID Gen | Función molecular | Tolerancia |
|------------|--|--------------------------------------|-------------------|
| AtPCS1 | Phytochelatín synthase | Quelación de metales | Metales pesados |
| SODc | Superoxide dismutase (Cu-Zn), chloroplast | Actividad antioxidante | Arsénico |
| GST20 | Glutathione S-transferase GST20, Tau class | Actividad de la glutatión tranferasa | Arsénico |

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Identificación de Genes

Mediante la identificación de genes que participan en diferentes rutas metabólicas, tales como la ruta de las poliaminas, síntesis del carbono y osmólisis. Las rutas mencionadas se relacionan directamente con el estrés abiótico en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* de la que se obtuvieron algunas secuencias genéticas de la plataforma The Arabidopsis Information Resource (TAIR). Jarvis *et al.* en el año 2017, publicó un estudio sobre la secuenciación del genoma completo de *Chenopodium quinoa*, esta investigación ayudo a identificar genes homólogos que se ven afectados en ambas plantas. Posteriormente mediante el uso de herramientas bioinformáticas como Phytozome v12.1, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) & National Center for Biotechnology Information (NCBI), se realizó una comparación de secuencias de los genes encontrados en la planta modelo relacionándolo con el genoma de la quinua según se indica en la siguiente tabla:

Tabla 12. Genes identificados en *Chenopodium quinoa*

| Gen | Gen ID | Función molecular | Tolerancia | Locus |
|--------|---|--|--------------------|------------------------|
| GST20 | Glutathione S-transferase GST20, Tau class | Actividad del glutatión transferasa | Arsénico | AUR62020080 -RA CDS |
| AtPCS1 | phytochelatin synthase | Quelación de metales | Metales pesados | AUR62025484 -RA CDS |
| SODc | superoxide dismutase (Cu-Zn), choroplast | Actividad antioxidante | Arsénico | AUR62029152 -RA CDS |

Fuente: Phytozome v12.1 (2020) y BLAST & NCBI (2020)

Para el estudio se seleccionaron tres genes: Glutathione S-transferase (GST20), Phytochelatin synthase (PCS1) y Superoxide dismutase (SODc), debido a la importancia de tienen frente a diferentes tipos de estrés abiótico y la manera en que actúan activando diferentes rutas metabólicas como actividades de tiol transferasa

dependientes de glutatión (UniProtKB, 2020), participación en la síntesis de fitoquelatinas (UniProtKB, 2020) y la destrucción de radicales tóxicos para las células (UniProtKB, 2020) respectivamente, de los cuales se evaluó su expresión génica frente a la presencia de arseniato.

3.1.2 Expresión del Gen GST20

En la Tabla 15 (Anexo 2), se muestran los datos que fueron utilizados para el cálculo de la expresión génica del gen GST20.

En los Gráficos 2 y 3 se presenta la expresión del gen GST20 en todos los tratamientos, a dosis de 0.3 mM y 0.5 mM de arseniato, respectivamente. Se puede observar que el Tratamiento T9 (V1D1H2) es el que manifiesta una menor expresión de este gen con un valor de 0.0033 ± 0.0011 , mientras que el Tratamiento T30 (V2D2H4) es el que presenta una mayor respuesta génica con 10.8848 ± 3.6953 .

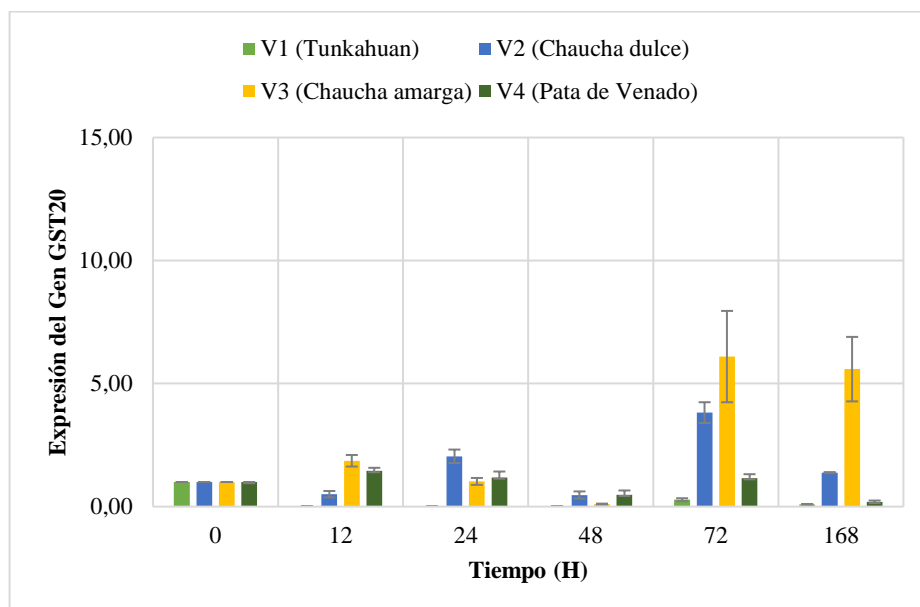


Gráfico 2. Expresión del gen GST20 a 0.3 mM de arseniato

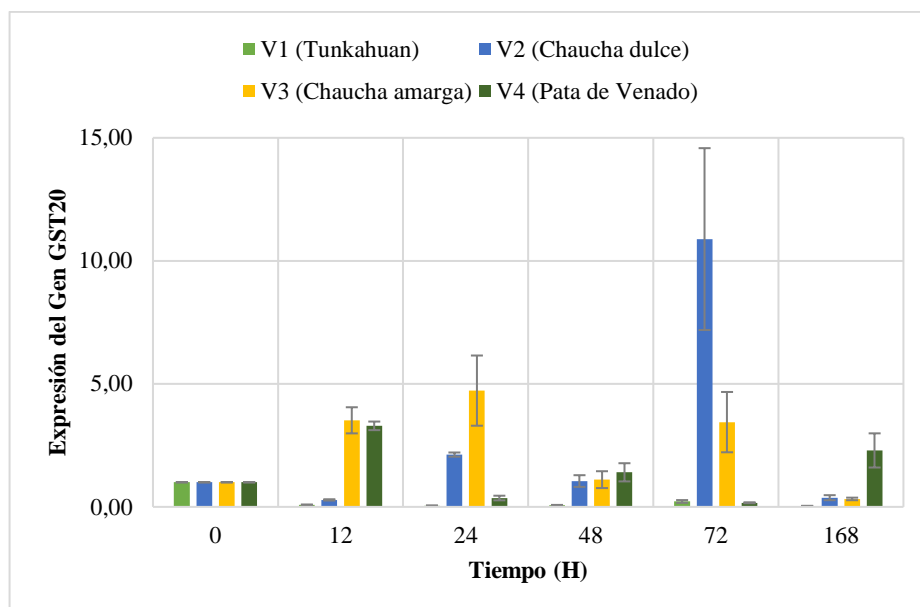


Gráfico 3. Expresión del gen GST20 a 0.5 mM de arseniato

El análisis de varianza (Tabla 18, Anexo 3) indica que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) en la dosis de arseniato y diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en la variedad y en el tiempo.

Prueba de Tukey

Variedad: En la Tabla 19 (Anexo 3), se detalla de forma estadística que las variedades de quinua con una mayor respuesta génica frente al estrés por arseniato son la variedad V3 (Chaucha amarga) seguida de la variedad V2 (Chaucha dulce), posteriormente la variedad V4 (Pata de Venado) y finalmente la variedad V1 (Tunkahuan).

Dosis: Con respecto a este factor, la Tabla 20 (Anexo 3) expone que la dosis de arseniato que induce una mayor expresión del gen GST20 se encuentra en los tratamientos sometidos a 0.5 mM de arseniato.

Tiempo: Por otro lado, en la Tabla 21 (Anexo 3) se evidencia una respuesta génica progresiva a través del tiempo de estudio, teniendo una máxima respuesta génica a las 72 horas y luego dicha expresión decrece.

Discusión

Observando los resultados obtenidos en el análisis anterior se demuestra que de las variedades de quinua estudiadas la V2 al estar expuesta a una dosis de 0,5 mM de arseniato durante un periodo de 72 horas el gen GST20 tiene una mayor respuesta génica por lo que se podría deducir que se ve involucrado en la síntesis de enzimas GST que intervienen en ciertos procesos vitales esto lleva a una mayor protección de las células contra el daño por este metal pesado.

Un estudio realizado sobre la identificación de los genes involucrados en el metabolismo y desintoxicación de As en *Crambe abyssinica* en el año 2010, en el cual germinaron y cultivaron semillas en matraces con medio de agar 0.5 x MS bajo condiciones controladas en periodos de luz, oscuridad y agitación constantes. Después de 10 días se aplicaron las diferentes dosis de Arseniato (0, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 μ M), las plantas lo mantuvieron durante 7 días más, posteriormente recolectaron y almacenaron las plántulas, aislaron ARN, sintetizaron cDNA y realizaron pruebas de PCR-Select determinando que el gen GST participa en la desintoxicación de compuestos endógenos y xenobióticos con centros electrofílicos mediante la adición nucleofílica de glutatión (Paulose *et al.*, 2010).

3.1.3 Expresión del Gen PCS1

En la Tabla 16 (Anexo 2), se manifiestan los datos utilizados para el cálculo de la expresión génica del gen PCS1.

Los Gráficos 4 y 5 reflejan la expresión del gen PCS1 en todos los tratamientos, a dosis de 0.3 mM y 0.5 mM de arseniato, respectivamente. Se puede observar que el Tratamiento T38 (V2D2H5) es el que evidencia una menor expresión de este gen con un valor de 0.0322 ± 0.0060 , mientras que el Tratamiento T30 (V2D2H4) es el que presenta una mayor respuesta génica con 26.0439 ± 3.7342 .

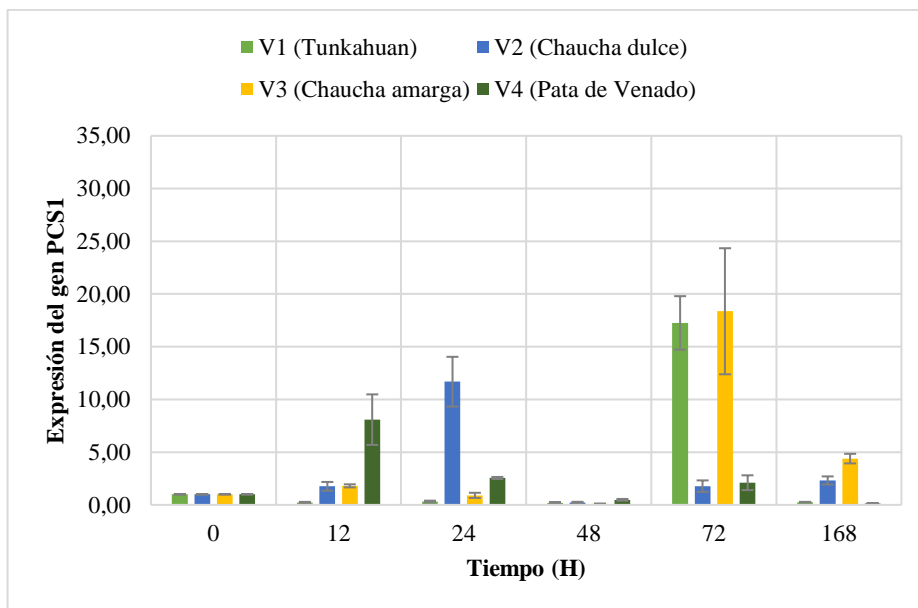


Gráfico 4. Expresión del gen PCS1 a 0.3 mM de arseniato

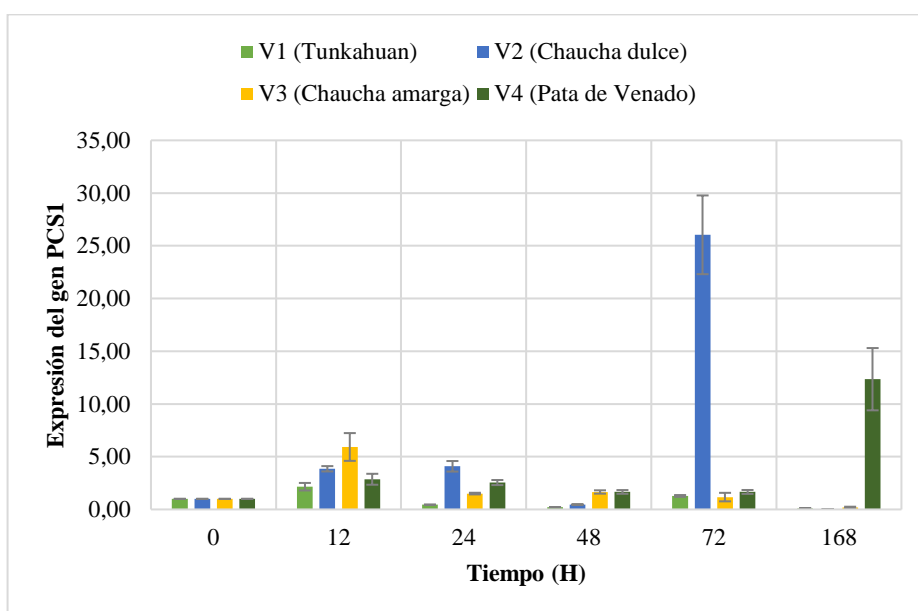


Gráfico 5. Expresión del gen PCS1 a 0.5 mM de arseniato

El análisis de varianza (Tabla 23, Anexo 3) indica que no existe diferencia significativa en la dosis de arseniato para este gen en estudio, pero que si existe diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en la variedad y en el tiempo.

Prueba de Tukey

Variedad: Para la expresión del Gen PCS1, teniendo en cuenta el factor variedad (Tabla 24, Anexo 3), se observa que estadísticamente la variedad de quinua con una mayor respuesta génica frente al estrés por arseniato es la variedad V2 (Chaucha dulce), seguida por las variedades V3 (Chaucha amarga) y V4 (Pata de Venado) y finalmente la variedad V1 (Tunkahuan).

Dosis: La dosis de arseniato no es un factor determinante sobre la expresión del Gen PCS1, ya que las dos dosis no presentan diferencias estadísticamente significativas por lo que se puede argumentar que el gen se expresa de una manera semejante tanto a 0.3 mM de arseniato como a 0.5 mM (Tabla 25, Anexo 3).

Tiempo: La expresión de este gen presenta una tendencia creciente a través del tiempo de estudio alcanzando un punto máximo de expresión a las 72 horas y luego nuevamente decrece (Tabla 26, Anexo 3).

Discusión

De los resultados obtenidos en el análisis anterior se demuestra que las accesiones de quinua estudiadas, la V2 al estar expuesta a una dosis de 0.5 mM de arseniato durante un periodo de 72 horas el gen PCS1 tiene una mayor respuesta génica deduciendo de esta manera que este gen participa en la síntesis de fitoquelatinas, mismas que participan en la tolerancia de las plantas de quinua a metales pesados, en nuestro caso al arseniato.

Un estudio realizado por Yadav en el año 2010 menciona que la mostaza india (*B. juncea*) expresa el gen AtPCS1 de la planta modelo *A. thaliana*, este gen codifica fitoquelatinas que intervienen en la tolerancia al estrés por arsénico, esto es prometedor ya que permite el desarrollo de plantas transgénicas y líneas genéticas con una mayor tolerancia a metales pesados.

3.1.4 Expresión del Gen SODc

En la Tabla 17 (Anexo 1), se indican los valores utilizados para el cálculo de la expresión génica del gen SODc.

En los Gráficos 6 y 7 se muestra la expresión del gen SODc en todos los tratamientos, a dosis de 0.3 mM y 0.5 mM de arseniato, respectivamente. Se puede observar que el Tratamiento T9 (V1D1H2) es el que menos expresión génica manifiesta con valores de 0.0084 ± 0.0023 , mientras que el Tratamiento T30 (V2D2H4) es el que presenta una mayor respuesta génica con 31.1608 ± 6.9151 .

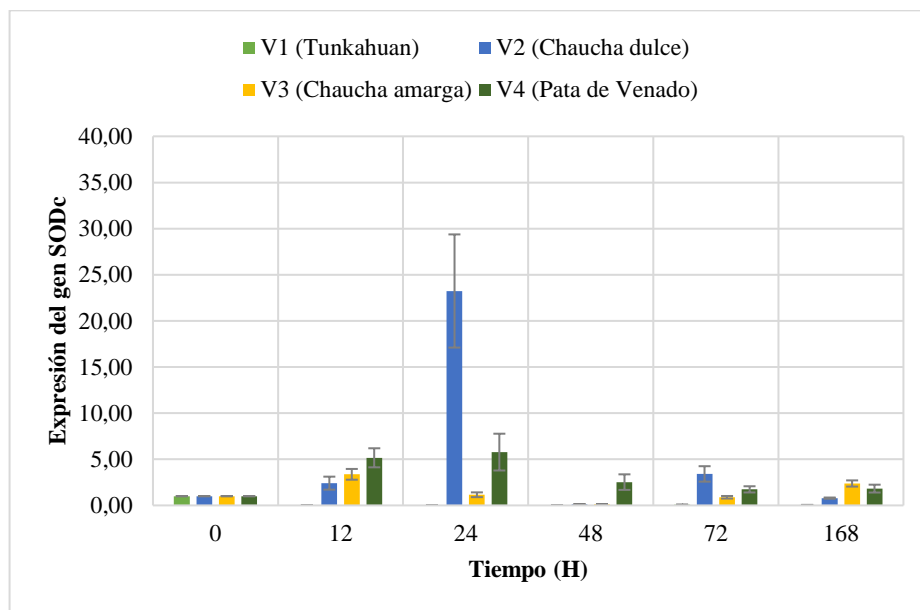


Gráfico 6. Expresión del gen SODc a 0.3 mM de arseniato

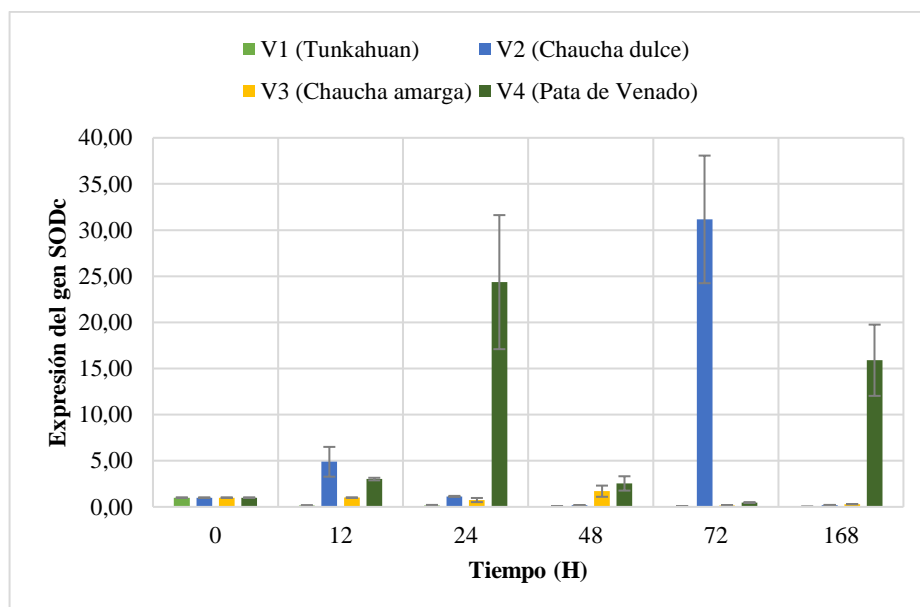


Gráfico 7. Expresión del gen SODc a 0.5 mM de arseniato

El análisis de varianza (Tabla 28, Anexo 3) demuestra que si existe diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) tanto en la dosis de arseniato como en la variedad y el tiempo.

Prueba de Tukey

Variedad: Para la expresión del Gen SODc de acuerdo con la variedad (Tabla 29, Anexo 2), nos da que las variedades de quinua que mayor respuesta génica tienen son V2 (Chaucha dulce) y V4 (Pata de Venado), seguida por las variedades V3 (Chaucha amarga) y V1 (Tunkahuan) que son las que menos expresan el gen.

Dosis: Con respecto a la dosis de arseniato que induce la expresión del gen SODc se tiene que a la dosis de arseniato de 0.5 mM existe una mayor expresión del gen, mientras que a la dosis de 0.3 mM de arseniato dicha expresión es menor (Tabla 30, Anexo 2).

Tiempo: Estadísticamente, se evidencia que el tiempo en el que hay mayor expresión génica es a las 24 horas (Tabla 31, Anexo 2).

Discusión

Con los resultados obtenidos en el análisis anterior, se demostró que, de las variedades de quinua estudiadas, la V2 al estar expuesta a una dosis de 0.5 mM de arseniato durante un periodo de 72 horas, el gen SODc tiene una mayor respuesta génica; concluyendo que este gen se ve involucrado en la activación de superóxido dismutasa, que evita el daño oxidativo causado por agentes que alteran fisiológicamente las plantas.

En una investigación realizada el año 2008 por Abercrombie et al. en la planta modelo *A. thaliana* obtuvieron que la exposición de esta planta a arseniato inducía de manera elevada la actividad del gen SODc activando la síntesis superóxido dismutasa como primera línea de defensa frente a radicales tóxicos dentro de la planta.

3.1.5 Accesoión de Quinua con mayor Respuesta Génica

Se encontró que de las diferentes accesiones de quinua en las que se evaluó la expresión de los genes en estudio, se presentan los siguientes valores:

Tabla 13. Accesiones de quinua con una mayor expresión génica

| Gen | V1 | V2 | V3 | V4 |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| GST20 | T25 (V1D1H4) | T30 (V2D2H4) | T27 (V3D1H4) | T8 (V4D2H1) |
| | 0,2808±0,0587 | 10,8848±3,6953 | 6,0976±1,8561 | 3,2940±0,1743 |
| PCS1 | T25 (V1D1H4) | T30 (V2D2H4) | T27 (V3D1H4) | T40 (V4D2H5) |
| | 17,2552±2,5397 | 26,0439±3,7342 | 18,3629±5,9766 | 12,3491±2,9530 |
| SODc | T13 (V1D2H2) | T30 (V2D2H4) | T3 (V3D1H1) | T16 (V4D2H2) |
| | 0,1584±0,0572 | 31,1608±6,9151 | 3,3687±0,5837 | 24,3603±7,2648 |

En la tabla anterior se muestran todos los tratamientos pertenecientes a cada una de las variedades que han presentado mayor expresión o respuesta génica para los tres genes en estudio, frente a las diferentes dosis de arseniato y a los tiempos de estudio, los mismos que ocasionan en la quinua estrés abiótico.

De lo anterior se puede deducir que la accesión de quinua que presenta una mayor respuesta génica es V2 (Chaucha dulce) a una concentración de 0.5 mM de arseniato y a un tiempo de 72 horas, coincidiendo el tratamiento T30 (V2D2H4) con los valores siguiente para los tres genes: para el gen GST20 con un valor de expresión génica de 10.8848 ± 3.6953 ; para PCS1 un valor de 26.0439 ± 3.7342 y para el gen SODc 31.1608 ± 6.9151 .

3.2 Verificación de Hipótesis

Se ha comprobado la hipótesis siguiente: “El estrés ocasionado por Arseniato aplicado a diferentes concentraciones [0.3 y 0.5 mM] generan una respuesta génica en referencia al gen constitutivo en las cuatro accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)”; cuando se utilizan concentraciones de 0.3 y 0.5 mM de Arseniato y a varios tiempos empleados en el estudio, existe una respuesta de los tres genes de estudio GST20 (Glutathione S-transferase), PCS1 (Phytochelatin synthase) y SODc (Superoxide dismutase) en las cuatro variedades de quinua estudiadas, en la Tabla 12 se presentan los tratamientos que tuvieron una mayor respuesta génica y de todos estos el gen SODc es el que más se expresa ante el estrés abiótico por arseniato con un valor máximo de 31.1608 ± 6.9151 para el tratamiento T30 (V2D2H4) en la variedad Chaucha dulce a una dosis de 0.5 mM y a un tiempo de exposición de 72 horas.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas (TAIR, Phytozome v12.1, BLAST & NCBI) se identificaron distintos genes que intervienen en la activación de rutas metabólicas en la planta modelo (*Arabidopsis thaliana*), los mismos que fueron comparados con el genoma de la quinua (*Chenopodium quinoa*), determinando que dichos genes se ven involucrados en la respuesta génica de este pseudocereal frente a la exposición por arseniato.

Los resultados de la investigación demuestran que, al analizar la expresión génica de las cuatro variedades de quinua bajo condiciones de estrés por arseniato, se obtiene que los genes GST20, PCS1 y SODc se expresan tanto a una dosis de 0.3 y 0.5 mM en los diferentes tiempos de estudio, pero sobresaliendo el gen SODc en el tratamiento T30 (V2D2H4) a un tiempo de 72 horas y 0.5 mM de arseniato, con respecto a la expresión de los otros genes.

Se utilizó método de PCR en tiempo real para evaluar la expresión génica de cuatro accesiones de quinua, permitiendo amplificar secuencias de DNA para obtener datos cuantitativos de la expresión de cada una de las muestras evaluadas, permitiendo desarrollar una comparación entre cada gen de cada variedad a un determinado tiempo y dosis, con lo que se determina su mayor o menor expresión génica.

Se identificó la variedad de quinua que presentó una mayor respuesta génica como la Chaucha dulce (V2) a un tiempo de 72 horas y 0.5 mM de arseniato, coincidiendo en el tratamiento V2D2H4 (T30) para los tres genes estudiados.

4.2 Recomendaciones

Un limitante durante la investigación fue la falta de información en el repositorio dentro de la biblioteca de la universidad sobre el tema estudiado, esto debido a que aún no se han realizado trabajos investigativos en este campo. Al no encontrarse información suficiente, ni estudios realizados, por ello consideramos que este proyecto es innovador y queda la apertura para seguir realizando investigaciones relacionadas a este tema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, J., Halfhill, M., Ranjan, P., Rao, M., Saxton, A., Yuan, J., & Stewart-Jr, C. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biology*, 8(87), 1-15. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-87>
- Apaza, V., Cáceres, G., Estrada, R., & Pinedo, R. (2013). *Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú* (Primera ed.). Lima. Recuperado el 19 de Julio de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-as890s.pdf>
- Applied Biosystems™. (2019). PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. *ThermoFisher Scientific*, 5. Recuperado el 1 de Diciembre de 2019, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A25741#/A25741>
- Arenas, L., & Heredia, A. (2017). *Calidad y Germinación de Semillas de Quinua *Chenopodium quinoa* Willd. Almacenadas Artesanalmente por Productores*. Tesis Ing. Agronomo, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A., Programa de Ingeniera Agronomica, Bogotá. Recuperado el 19 de Julio de 2019, de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/766/1/Trabajo%20de%20grado%20Calidad%20y%20germinaci%C3%B3n%20de%20semillas%20de%20quinua%20Chenopodium%20quinoa%20Willd.%20almacenada.pdf>
- BLAST & NCBI. (2020). Nucleotide. *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) & NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, 1. Recuperado el 19 de Marzo de 2020, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_034949.1
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lenzian, K., & Grill, E. (2007). Function of phytochelatase synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *National Library of Medicine*, 49(4), 9. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02993.x>
- Bosque, H., Lemeur, R., & Van Damme, P. (2000). Análisis ecofisiológico del cultivo de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones de estrés de la

sequía y la salinidad. *Tropicultura*, 18(4), 198-202. Recuperado el 26 de Diciembre de 2019, de <http://www.tropicultura.org/text/v18n4/198.pdf>

Cabezas, J., Alonso, J., Pastor, J., Sastre, I., & Lobo, M. (2004). Absorción y acumulación de metales pesados en tres especies vegetales en suelos enmendados con lodos de depuradora. *Environmental Biotechnology and Engineering*, 1-13. Retrieved Noviembre 10, 2020, from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/52285/1/absorcionyacu2004852.pdf>

Calla, J. (2012). *Manejo Agronómico del Cultivo De La Quinua*. Chiara, Ayacucho, Perú. Recuperado el 2019 de Diciembre de 2019

Cazar, P., & Alava, H. (2004). *Producción y comercialización de quinua en el Ecuador*. Tesis Ing. Comercial y Empresarial Especialización Finanzas, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas (ICHE), Guayaquil. Recuperado el 18 de Noviembre de 2020, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3622/1/6149.pdf>

Costa, S. (2014). *Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. en el Noroeste Argentino y su relación con la dispersión de la especie*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Argentina. doi:<https://doi.org/10.35537/10915/43830>

Eisenberg, E., & Levanon, E. (2013). Human housekeeping genes, revisited. 29(10), 569-574. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>

Esprella, B. (2011). *Evaluación del rendimiento del cultivo de Quinua (*Chenopodium quínoa* Willd.) con la aplicación de niveles de abono orgánico bajo condiciones de riego deficitario en el Altiplano Central*. Tesis Ing. Agrónomo, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, La Paz. Recuperado el 5 de Octubre de 2020, de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/8085/T-1644.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

FAO. (2019). *Alimento nutritivo: Plataforma de información de la quinua, Propiedades nutricionales*. (O. d. Agricultura, Editor) Recuperado el 23 de

Mayo de 2020, de <http://www.fao.org/in-action/quinoa-platform/quinoa/alimento-nutritivo/en/>

- Fiallos, M. (2017). *Cuantificación de metales pesados y calidad microbiológica de frutas y vegetales que se expenden en el mercado mayorista de la ciudad de Ambato*. Tesis Ing. Bioquímica, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato. Retrieved Enero 19, 2020, from <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25296/1/BQ%20111.pdf>
- Filiz, E., Saracoglu, I., Ozyigit, I., & Yalcin, B. (2019). Comparative analyses of phytochelatin synthase (PCS) genes in higher plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 178-194. doi:<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1559096>
- Finnegan, P., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3(182), 1-18. doi:<https://dx.doi.org/10.3389%2Ffphys.2012.00182>
- Gabriel, J., Luna, N., Vargas, A., Magne, J., Angulo, A., La Torre, J., & Bonifacio, A. (2012). Quinoa de valle (*Chenopodium quinoa* Willd.): fuente valiosa de resistencia genética al mildiu (*Peronospora farinosa* Willd.). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3(2), 27-44. Recuperado el 26 de Abril de 2020, de http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v3n2/v3n2_a04.pdf
- Garg, N., & Singla, P. (2011). Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters*, 9, 303-321. doi:<https://doi.org/10.1007/s10311-011-0313-7>
- Gasic, K., & Korban, S. (2007). Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Springer Science, Plant Molecular Biology*, 64, 361-369. doi:<https://doi.org/10.1007/s11103-007-9158-7>
- Gómez, L., & Aguilar, E. (2016). *Guía de cultivo de la quinoa: MORFOLOGÍA* (Segunda ed.). (© y. Molina, Ed.) Lima, Perú. Recuperado el 13 de Julio de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-i5374s.pdf>

- González, S. (2009). *Estudio de flujo de genes en Quinoa (Chenopodium Quinoa W.) en campo de agricultores mediante el uso de Marcadores Microsatélites*. Tesis Ing. Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida , Sangolquí. Recuperado el 15 de Noviembre de 2020, de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/745/1/T-ESPE-024834.pdf>
- Houkpe, B., Chenou, F., de Lima, F., & De Paula, E. (2020). HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Research*, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa609>
- IICA. (2015). *El mercado y la producción de quinua en el Perú: El cultivo de quinua* (Primera ed.). (E. Soto, Ed.) Lima, Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Retrieved Octubre 20, 2019, from <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/2652/1/BVE17038730e.pdf>
- InterPro. (2020). Classification of protein families: Phytochelatin synthase, N-terminal catalytic domain. Hinxton, South Cambridgeshire, England. Recuperado el 20 de Noviembre de 2020, de <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR007719/>
- Islam, E., Khan, M., & Irem, S. (2015). Biochemical mechanisms of signaling: Perspectives in plants under arsenic stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 126-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.017>
- Jacobsen, S., & Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador: Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. (C. (. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), Ed.) Quito, Ecuador: Abaya-Yala. Recuperado el 14 de Marzo de 2020, de https://books.google.com.ec/books?id=s73gc3GcpcC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Jarvis, DE; Ho, YS; Lightfoot, DJ; Schmöckel, SM; Li, B; Borm, TJA; Ohyanagi, H; Mineta, K; Michell, CT; Saber, N; Kharbatia, NM; Rupper, RR; Sharp, AR; Dally, N; Boughton, BA; Woo, YH; Gao, G; Schijlen, EGWM; Guo, X; Momin, AA; Negrão, S; Al-Babili, S; Gehring, C;Roessner, U; Jung, C; Murph, K; Arold, ST; Gojobori, T; van-der-Linden, CG; van-Loo, EN; Jellen,

- EN; Maughan, PJ; Tester, M. 2017. The genome of *Chenopodium quinoa* (en línea). *Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature*, 542(21370):307-326. Consultado 14 jun. 2019. Disponible en DOI <https://doi.org/10.1038/nature21370>
- León-Lobos, P., Zurita-Silva, A., Veas, E., Alfaro, C., Matus, I., Ruf, K., . . . Quiroz, C. (2015). *El cultivo de la quínoa en Chile: Antecedentes generales de la quínoa*. (I. Matus, Ed.) Rengo, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Recuperado el 23 de Mayo de 2020, de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR41416.pdf>
- Líderes. (2018). La quinua perdió protagonismo por baja en el mercado mundial. *Revista Líderes*, pág. 3. Recuperado el 18 de Noviembre de 2019, de <https://www.revistalideres.ec/>
- Machín, A., Chávez, E., Héctor, E., Santos, M., & Pérez, S. (2017). Actividad de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Amalia en respuesta al plomo. *Horticultura Brasileira*, 35(2), 216-223. doi:<https://doi.org/10.1590/s0102-053620170210>
- Mancilla, Ó., Ortega, H., Ramírez, C., Uscanga, E., Ramos, R., & Reyes, A. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 39-48. Retrieved Junio 14, 2020, from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Mina, D. (2014). *Evaluación Agronómica de Líneas F5 de Quinua (Chenopodium quinoa Willd.), en dos localidades de la Serranía, Ecuador*. Tesis Ing. Agrónomo, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito. Recuperado el 1 de Noviembre de 2020, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2560/1/T-UCE-0004-78.pdf>
- Monk, L., Fagerstedt, K., & Crawford, R. (1989). Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum*, 76(3), 456-459. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb06219.x>

- Moons, A. (2005). Regulatory and Functional Interactions of Plant Growth Regulators and Plant Glutathione S-Transferases (GSTs). *Vitamins & Hormones*, 72, 155-202. doi:[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72005-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72005-7)
- Moreno, V. (2016). *Validación del Protocolo de Control Interno de Calidad para la Producción de Semilla de Quinoa Variedad (INIAP Tunkahuan), bajo dos tipos de fertilización, CADER, 2015*. Tesis Ing. Agronoma, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito. Recuperado el 22 de Noviembre de 2020, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7987/1/T-UCE-0004-18.pdf>
- Morillo, A., Castro, M., & Morillo, Y. (2017). Caracterización de la diversidad genética de una colección de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 49-56. Retrieved Julio 26, 2019, from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15n2/v15n2a06.pdf>
- Mujica, A. (1995). *Cultivo de Quinoa*. (P. T. INIA, Ed.) Serie Manual.
- Mujica, A., Canahua, A., & Saravia, R. (2004). *Capítulo II: Agronomía del cultivo de la quinoa*. (FAO, Ed.) Lima, Perú. Recuperado el 28 de Agosto de 2020, de <https://www.ciq.org.bo/images/recursosInformacion/repositorioDigital/16%20LIBRO%20Quinoa-ancestral-cultivo-de-los-andes-r-miranda.pdf>
- Mujica, A., Jacobsen, S., Izquierdo, J., & Marathee, J.-P. (2001). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) Ancestral cultivo andino: Origen y descripción de la quinoa*. Santiago, Chile: FAO. Recuperado el 20 de Noviembre de 2020, de <https://www.ciq.org.bo/images/recursosInformacion/repositorioDigital/16%20LIBRO%20Quinoa-ancestral-cultivo-de-los-andes-r-miranda.pdf>
- Nebert, D., & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 1(6), 460-464. doi:<https://doi.org/10.1186/1479-7364-1-6-460>

- Parker, J., Parker, K., & Keller, L. (2004). Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects. *Insect Molecular Biology*, 13(6). doi:<https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00515.x>
- Paulose, B., Kandasamy, S., & Dhankher, O. (2010). Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. *BMC Plant Biology*, 10(108), 1-12. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-108>
- Peralta, E. (2009). *La quinua en Ecuador: Estado del arte*. (INIAP, Ed.) Quito, Pichincha, Ecuador. Retrieved Julio 19, 2019, from <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/805/1/iniapsclgaq1.pdf>
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, Á., Rivera, M., & Monar, C. (2008). *Manual agrícola de granos andinos: Chocho, quinua, amaranto y ataco (Cultivos, variedades y costos de producción)*. (I. Estación Experimental Santa Catalina, Ed.) Quito, Ecuador: Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Recuperado el 17 de Noviembre de 2020, de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/833/4/iniapscm69.pdf>
- Pérez de Castro, A. (2010). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Indorme de Laboratorio, Universidad Politécnica de Valencia, Biología, Valencia. Recuperado el 15 de Noviembre de 2020, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Phytozome v12.1. (2020). Phytozome quick search. *Phytozome v12.1*, 1. Recuperado el 1 de Agosto de 2019, de <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>
- Ramírez, C., Romero, G., & Gómez, J. (2016). Respuesta morfoagronómica y calidad en proteína de tres accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la Sabana norte de Bogotá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 3(2), 8. Recuperado el 30 de Diciembre de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n2/v19n2a09.pdf>
- Repetto, J. (2017, Marzo 13). Con su mapa genético, la quinoa avanza en el mejoramiento. *Sobre La Tierra*, p. 3. Retrieved Julio 26, 2019, from

<http://sobrelatierra.agro.uba.ar/con-su-mapa-genetico-la-quinoa-avanza-en-el-mejoramiento/>

RODAS. (2020). *Repositorio de Objetos de Aprendizaje de la Universidad de Sevilla*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2020, de https://rodas5.us.es/file/6dd7729c-aca-643c-5fd7-3606ff7fa6ca/1/estres_radiacion_apuntes_SCORM.zip/page_24.htm

Sánchez, M. d. (2013). *Cultivo de la Quinoa en Ancash: Una alternativa nutritiva para el mundo* (Primera ed.). (D. R. Ancash, Ed.) Ancash, Perú. Recuperado el 19 de Octubre de 2019, de <https://agroancash.gob.pe/agro/wp-content/uploads/2016/06/libro-quinoa.pdf>

Sappl, P., Carroll, A., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Millar, A., & Singh, K. (Abril de 2009). The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58(1), 53-68. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19067976/>

Sappl, P., Oñate, L., Singh, K., & Millar, H. (2004). Proteomic Analysis of Glutathione S-Transferases of Arabidopsis thaliana Reveals Differential Salicylic Acid-Induced Expression of the Plant-Specific Phi and Tau Classes. *Plant Molecular Biology*, 54, 205-219. doi:<https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000028786.57439.b3>

Schmöger, M., Oven, M., & Grill, E. (2000). Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. *American Society of Plant Physiologists*, 122, 793-801. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.122.3.793>

Scocianti, V., Bucchini, A., Iacobucci, M., Ruiz, K., & Biondi, S. (2016). Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 25-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.036>

- SESAN. (2013). *Investigación sobre el cultivo de la Quinua o Quinoa (Chenopodium quinua)*. (S. d. Nutricional, Ed.) Guatemala. Recuperado el 31 de Diciembre de 2019
- Simancas, V., & Litardo, M. (2015). *Estudio de factibilidad para la producción y exportación de una bebida a base de quinua orgánica hacia el Mercado Holandés en el periodo 2015 – 2020*. Tesis Ing. Comercio Exterior, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Administrativas, Guayaquil. Recuperado el 26 de Diciembre de 2019, de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/10683/1/Tesis%20Bebida%20de%20Quinua.pdf>
- TAIR. (2020). Arabidopsis. *The Arabidopsis Information Resource*, 1. Recuperado el 19 de Marzo de 2020, de <https://www.arabidopsis.org/>
- Tapia, G. (2014). *Proyecto: Fomento a la Producción de Quinua en la Sierra Ecuatoriana*. (M. A. INIAP, Ed.) Quito, Ecuador. Retrieved Octubre 20, 2019, from <http://repositorio.iniap.gob.ec/>
- Tripathi, R., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D., & Trivedi, P. (2012). Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. *Frontiers in Physiology*, 3(275), 14. doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00275>
- Tropicos.org. (2020). *Tropicos®*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2020, de <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=7200325&langid=66>
- UniProtKB. (2020). Protein: Glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase 1. *BLAST*, 5. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9S7Z3>
- UniProtKB. (2020). Protein: Glutathione S-transferase U20. *BLAST*, 10. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8L7C9>
- UniProtKB. (2020). Protein: Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2, chloroplastic. *BLAST*, 5. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/O78310>

- Vatamaniuk, O., Mari, S., Lu, Y.-P., & Rea, P. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: Isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7110-7115. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7110>
- Wuana, R., & Okieimen, F. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. (A. Steinman, Ed.) *International Scholarly Research Notices*, 2011, 20. Retrieved Mayo 25, 2020, from <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/402647/>
- Yadav, S. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal Botany*, 76(2), 167-179. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yu, J., Xue, J.-H., & Zhou, S.-L. (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 176-181. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x>

ANEXOS

Anexo 1. Forward and reverse primers utilizados para el qPCR Real Time

Tabla 14. Forward and reverse primers

| Oligo | Sequences |
|--------------|--|
| <i>GST20</i> | FW:5'-CAAGCTCGTTTTTGGGCTGAT -3' RV: 5'-GCTCAATGAATTCCTTCCTCGC -3' |
| <i>PCSI</i> | FW:5'-CCTATGCAAACGTGGTCTGG -3' RV: 5'-GACGTCGCAAGTGCAATACC -3' |
| <i>SODc</i> | FW:5'-TGGCTGAGGCTACCATTGTT -3' RV: 5'-GTCCACCCTTTCCAAGGTCAT -3' |
| <i>MAT k</i> | FW:5'-AATTCGATGCCACAGTTCCA -3' RV: 5'-CGGTCCAGACCGACTTACTA -3' |

Anexo 2. Resultados experimentales obtenidos en laboratorio mediante qPCR

Tabla 15. Resultados del análisis del Gen GST20

| Tratamiento | Codificación | Repetición | Gen de estudio | Gen constitutivo de referencia | Est/Ref | Promedio | SD | SE | Expresión del gen | Promedio | Desviación estándar |
|-------------|--------------|------------|----------------|--------------------------------|---------|----------|--------|--------|-------------------|----------|---------------------|
| C1 | V1C1H0 | R1 | 21,1741 | 17,6256 | 0,0855 | 0,1495 | 0,0905 | 0,0640 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 21,8502 | 19,6222 | 0,2134 | | | | 1,0000 | | |
| C2 | V2C1H0 | R1 | 20,4481 | 14,4784 | 0,0160 | 0,0143 | 0,0024 | 0,0017 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 20,7430 | 14,4319 | 0,0126 | | | | 1,0000 | | |
| C3 | V3C1H0 | R1 | 22,7298 | 17,4251 | 0,0253 | 0,0175 | 0,0111 | 0,0078 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 23,7635 | 17,0611 | 0,0096 | | | | 1,0000 | | |
| C4 | V4C1H0 | R1 | 24,8445 | 13,1620 | 0,0003 | 0,0102 | 0,0140 | 0,0099 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 24,5252 | 18,8918 | 0,0201 | | | | 1,0000 | | |
| T1 | V1D1H1 | R1 | 25,9150 | 15,5117 | 0,0007 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0049 | 0,0043 | 0,0009 |
| | | R2 | 25,6984 | 14,8555 | 0,0005 | | | | 0,0036 | | |
| T2 | V2D1H1 | R1 | 22,4073 | 15,5314 | 0,0085 | 0,0072 | 0,0019 | 0,0013 | 0,5965 | 0,5044 | 0,1301 |
| | | R2 | 23,6361 | 16,2280 | 0,0059 | | | | 0,4124 | | |
| T3 | V3D1H1 | R1 | 23,8567 | 19,0370 | 0,0354 | 0,0325 | 0,0041 | 0,0029 | 2,0291 | 1,8628 | 0,2352 |
| | | R2 | 23,9301 | 18,8521 | 0,0296 | | | | 1,6966 | | |
| T4 | V4D1H1 | R1 | 22,9235 | 16,9339 | 0,0157 | 0,0148 | 0,0013 | 0,0009 | 1,5392 | 1,4486 | 0,1281 |
| | | R2 | 23,9235 | 17,7532 | 0,0139 | | | | 1,3581 | | |
| T5 | V1D2H1 | R1 | 24,9810 | 18,8030 | 0,0138 | 0,0119 | 0,0027 | 0,0019 | 0,0924 | 0,0796 | 0,0181 |
| | | R2 | 25,4683 | 18,8218 | 0,0100 | | | | 0,0668 | | |
| T6 | V2D2H1 | R1 | 25,3031 | 17,4481 | 0,0043 | 0,0041 | 0,0004 | 0,0003 | 0,3026 | 0,2844 | 0,0257 |
| | | R2 | 25,5036 | 17,4639 | 0,0038 | | | | 0,2662 | | |
| T7 | V3D2H1 | R1 | 25,1133 | 20,9250 | 0,0549 | 0,0614 | 0,0093 | 0,0066 | 3,1433 | 3,5189 | 0,5311 |
| | | R2 | 24,5849 | 20,7058 | 0,0680 | | | | 3,8944 | | |
| T8 | V4D2H1 | R1 | 21,9048 | 17,0657 | 0,0349 | 0,0337 | 0,0018 | 0,0013 | 3,4172 | 3,2940 | 0,1743 |
| | | R2 | 22,6255 | 17,6785 | 0,0324 | | | | 3,1707 | | |
| T9 | V1D1H2 | R1 | 24,1409 | 13,4548 | 0,0006 | 0,0005 | 0,0002 | 0,0001 | 0,0041 | 0,0033 | 0,0011 |
| | | R2 | 24,3742 | 12,9566 | 0,0004 | | | | 0,0024 | | |
| T10 | V2D1H2 | R1 | 23,8641 | 18,8962 | 0,0320 | 0,0292 | 0,0039 | 0,0028 | 2,2383 | 2,0453 | 0,2729 |
| | | R2 | 24,7956 | 19,5546 | 0,0264 | | | | 1,8523 | | |
| T11 | V3D1H2 | R1 | 23,7137 | 18,0395 | 0,0196 | 0,0179 | 0,0024 | 0,0017 | 1,1222 | 1,0230 | 0,1403 |
| | | R2 | 24,8935 | 18,9385 | 0,0161 | | | | 0,9237 | | |
| T12 | V4D1H2 | R1 | 23,5685 | 17,3953 | 0,0139 | 0,0121 | 0,0025 | 0,0017 | 1,3553 | 1,1852 | 0,2405 |
| | | R2 | 23,9854 | 17,3953 | 0,0104 | | | | 1,0151 | | |
| T13 | V1D2H2 | R1 | 26,3759 | 18,8914 | 0,0056 | 0,0072 | 0,0022 | 0,0016 | 0,0374 | 0,0478 | 0,0148 |
| | | R2 | 25,4481 | 18,6063 | 0,0087 | | | | 0,0583 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| T14 | V2D2H2 | R1 | 24,5360 | 19,4524 | 0,0295 | 0,0303 | 0,0012 | 0,0009 | 2,0659 | 2,1260 | 0,0851 |
| | | R2 | 24,5360 | 19,5340 | 0,0312 | | | | 2,1861 | | |
| T15 | V3D2H2 | R1 | 24,0776 | 20,1313 | 0,0649 | 0,0825 | 0,0249 | 0,0176 | 3,7173 | 4,7260 | 1,4266 |
| | | R2 | 24,3971 | 21,0763 | 0,1001 | | | | 5,7348 | | |
| T16 | V4D2H2 | R1 | 25,9463 | 18,1058 | 0,0044 | 0,0037 | 0,0010 | 0,0007 | 0,4267 | 0,3603 | 0,0939 |
| | | R2 | 26,2686 | 17,8900 | 0,0030 | | | | 0,2939 | | |
| T17 | V1D1H3 | R1 | 27,8804 | 17,4153 | 0,0007 | 0,0009 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0047 | 0,0059 | 0,0016 |
| | | R2 | 28,0266 | 18,1215 | 0,0010 | | | | 0,0070 | | |
| T18 | V2D1H3 | R1 | 24,3423 | 16,7677 | 0,0052 | 0,0067 | 0,0021 | 0,0015 | 0,3675 | 0,4711 | 0,1465 |
| | | R2 | 23,5958 | 16,6663 | 0,0082 | | | | 0,5747 | | |
| T19 | V3D1H3 | R1 | 26,9193 | 17,6364 | 0,0016 | 0,0018 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0920 | 0,1040 | 0,0170 |
| | | R2 | 24,4005 | 15,4530 | 0,0020 | | | | 0,1161 | | |
| T20 | V4D1H3 | R1 | 26,2765 | 18,9422 | 0,0062 | 0,0050 | 0,0018 | 0,0012 | 0,6061 | 0,4845 | 0,1718 |
| | | R2 | 26,8949 | 18,8212 | 0,0037 | | | | 0,3630 | | |
| T21 | V1D2H3 | R1 | 24,0935 | 17,6250 | 0,0113 | 0,0095 | 0,0026 | 0,0018 | 0,0756 | 0,0633 | 0,0174 |
| | | R2 | 24,0589 | 17,0226 | 0,0076 | | | | 0,0510 | | |
| T22 | V2D2H3 | R1 | 24,8759 | 19,0303 | 0,0174 | 0,0150 | 0,0034 | 0,0024 | 1,2182 | 1,0499 | 0,2380 |
| | | R2 | 24,8137 | 18,5017 | 0,0126 | | | | 0,8816 | | |
| T23 | V3D2H3 | R1 | 25,6316 | 20,2239 | 0,0236 | 0,0193 | 0,0060 | 0,0042 | 1,3499 | 1,1074 | 0,3430 |
| | | R2 | 26,0782 | 20,0282 | 0,0151 | | | | 0,8648 | | |
| T24 | V2D2H3 | R1 | 23,9116 | 18,0367 | 0,0170 | 0,0144 | 0,0038 | 0,0027 | 1,6667 | 1,4053 | 0,3698 |
| | | R2 | 24,8892 | 18,4711 | 0,0117 | | | | 1,1438 | | |
| T25 | V1D1H4 | R1 | 23,8570 | 19,0518 | 0,0358 | 0,0420 | 0,0088 | 0,0062 | 0,2393 | 0,2808 | 0,0587 |
| | | R2 | 24,1953 | 19,8200 | 0,0482 | | | | 0,3224 | | |
| T26 | V2D1H4 | R1 | 20,2935 | 15,9794 | 0,0503 | 0,0545 | 0,0060 | 0,0043 | 3,5216 | 3,8204 | 0,4225 |
| | | R2 | 20,6263 | 16,5383 | 0,0588 | | | | 4,1192 | | |
| T27 | V3D1H4 | R1 | 22,7839 | 19,8329 | 0,1293 | 0,1064 | 0,0324 | 0,0229 | 7,4101 | 6,0976 | 1,8561 |
| | | R2 | 23,7533 | 20,1713 | 0,0835 | | | | 4,7852 | | |
| T28 | V4D1H4 | R1 | 24,8455 | 18,5797 | 0,0130 | 0,0118 | 0,0016 | 0,0012 | 1,2711 | 1,1584 | 0,1594 |
| | | R2 | 24,5402 | 17,9928 | 0,0107 | | | | 1,0457 | | |
| T29 | V1D2H4 | R1 | 24,9000 | 20,2181 | 0,0390 | 0,0331 | 0,0083 | 0,0059 | 0,2607 | 0,2214 | 0,0555 |
| | | R2 | 24,9953 | 19,7968 | 0,0272 | | | | 0,1822 | | |
| T30 | V2D2H4 | R1 | 38,0436 | 34,9615 | 0,1181 | 0,1554 | 0,0528 | 0,0373 | 8,2718 | 10,8848 | 3,6953 |
| | | R2 | 38,0436 | 35,6679 | 0,1927 | | | | 13,4978 | | |
| T31 | V3D2H4 | R1 | 22,5247 | 18,0510 | 0,0450 | 0,0601 | 0,0214 | 0,0151 | 2,5790 | 3,4455 | 1,2255 |
| | | R2 | 21,9076 | 18,1754 | 0,0753 | | | | 4,3121 | | |
| T32 | V4D2H4 | R1 | 29,9817 | 20,6654 | 0,0016 | 0,0017 | 0,0002 | 0,0001 | 0,1534 | 0,1671 | 0,0193 |
| | | R2 | 31,0019 | 21,9216 | 0,0018 | | | | 0,1807 | | |
| T33 | V1D1H5 | R1 | 24,5645 | 18,4035 | 0,0140 | 0,0131 | 0,0012 | 0,0009 | 0,0935 | 0,0877 | 0,0082 |
| | | R2 | 24,8179 | 18,4652 | 0,0122 | | | | 0,0819 | | |
| T34 | V2D1H5 | R1 | 25,6810 | 20,0326 | 0,0199 | 0,0197 | 0,0003 | 0,0002 | 1,3967 | 1,3818 | 0,0211 |
| | | R2 | 26,1806 | 20,5011 | 0,0195 | | | | 1,3669 | | |
| T35 | V3D1H5 | R1 | 27,4107 | 24,2736 | 0,1137 | 0,0975 | 0,0229 | 0,0162 | 6,5137 | 5,5869 | 1,3108 |
| | | R2 | 26,9993 | 23,3790 | 0,0813 | | | | 4,6600 | | |
| T36 | V4D1H5 | R1 | 22,8858 | 14,1625 | 0,0024 | 0,0020 | 0,0005 | 0,0004 | 0,2314 | 0,1951 | 0,0514 |
| | | R2 | 24,1225 | 14,8555 | 0,0016 | | | | 0,1587 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| T37 | V1D2H5 | R1 | 23,7472 | 16,3948 | 0,0061 | 0,0052 | 0,0013 | 0,0009 | 0,0409 | 0,0350 | 0,0084 |
| | | R2 | 24,4181 | 16,5713 | 0,0043 | | | | 0,0291 | | |
| T38 | V2D2H5 | R1 | 24,9039 | 17,6092 | 0,0064 | 0,0053 | 0,0014 | 0,0010 | 0,4462 | 0,3744 | 0,1015 |
| | | R2 | 25,0844 | 17,2300 | 0,0043 | | | | 0,3027 | | |
| T39 | V3D2H5 | R1 | 24,1768 | 16,8631 | 0,0063 | 0,0056 | 0,0009 | 0,0006 | 0,3602 | 0,3234 | 0,0520 |
| | | R2 | 24,6927 | 17,0497 | 0,0050 | | | | 0,2867 | | |
| T40 | V4D2H5 | R1 | 27,4419 | 21,6811 | 0,0184 | 0,0235 | 0,0071 | 0,0050 | 1,8039 | 2,2948 | 0,6943 |
| | | R2 | 27,0572 | 21,9234 | 0,0285 | | | | 2,7857 | | |

Tabla 16. Resultados del análisis del Gen PCS1

| Tratamiento | Codificación | Repetición | Gen de estudio | Gen constitutivo de referencia | Est/Ref | Promedio | SD | SE | Expresión del gen | Promedio | Desviación estándar |
|-------------|--------------|------------|----------------|--------------------------------|---------|----------|--------|--------|-------------------|----------|---------------------|
| C1 | V1C1H0 | R1 | 29,7917 | 17,6256 | 0,0002 | 0,0005 | 0,0004 | 0,0003 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 29,8393 | 19,6222 | 0,0008 | | | | 1,0000 | | |
| C2 | V2C1H0 | R1 | 24,9567 | 14,4784 | 0,0007 | 0,0007 | 0,0001 | 0,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 25,0690 | 14,4319 | 0,0006 | | | | 1,0000 | | |
| C3 | V3C1H0 | R1 | 26,6569 | 17,4251 | 0,0017 | 0,0013 | 0,0006 | 0,0004 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 27,2368 | 17,0611 | 0,0009 | | | | 1,0000 | | |
| C4 | V4C1H0 | R1 | 29,4214 | 13,1620 | 0,0000 | 0,0004 | 0,0005 | 0,0004 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 29,2582 | 18,8918 | 0,0008 | | | | 1,0000 | | |
| T1 | V1D1H1 | R1 | 28,2996 | 15,5117 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2674 | 0,2226 | 0,0633 |
| | | R2 | 28,2320 | 14,8555 | 0,0001 | | | | 0,1778 | | |
| T2 | V2D1H1 | R1 | 25,5353 | 15,5314 | 0,0010 | 0,0012 | 0,0003 | 0,0002 | 1,4657 | 1,7600 | 0,4161 |
| | | R2 | 25,7449 | 16,2280 | 0,0014 | | | | 2,0542 | | |
| T3 | V3D1H1 | R1 | 26,8962 | 18,0370 | 0,0022 | 0,0023 | 0,0002 | 0,0001 | 1,7037 | 1,8065 | 0,1454 |
| | | R2 | 27,5469 | 18,8521 | 0,0024 | | | | 1,9094 | | |
| T4 | V4D1H1 | R1 | 25,5998 | 16,9339 | 0,0025 | 0,0031 | 0,0009 | 0,0007 | 6,3932 | 8,0866 | 2,3948 |
| | | R2 | 25,1058 | 17,0532 | 0,0038 | | | | 9,7800 | | |
| T5 | V1D2H1 | R1 | 28,4203 | 18,8030 | 0,0013 | 0,0011 | 0,0002 | 0,0001 | 2,4076 | 2,1554 | 0,3566 |
| | | R2 | 28,7782 | 18,8218 | 0,0010 | | | | 1,9033 | | |
| T6 | V2D2H1 | R1 | 25,9918 | 17,4481 | 0,0027 | 0,0026 | 0,0002 | 0,0001 | 4,0327 | 3,8544 | 0,2522 |
| | | R2 | 26,1412 | 17,4639 | 0,0024 | | | | 3,6761 | | |
| T7 | V3D2H1 | R1 | 27,7763 | 20,9250 | 0,0087 | 0,0075 | 0,0017 | 0,0012 | 6,8527 | 5,9220 | 1,3162 |
| | | R2 | 28,0143 | 20,7058 | 0,0063 | | | | 4,9914 | | |
| T8 | V4D2H1 | R1 | 26,7183 | 17,0657 | 0,0012 | 0,0011 | 0,0002 | 0,0001 | 3,2261 | 2,8596 | 0,5184 |
| | | R2 | 26,7029 | 16,6785 | 0,0010 | | | | 2,4930 | | |
| T9 | V1D1H2 | R1 | 25,7507 | 13,4548 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 | 0,3760 | 0,3169 | 0,0837 |
| | | R2 | 25,4368 | 12,5957 | 0,0001 | | | | 0,2577 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| T10 | V2D1H2 | R1 | 26,1273 | 18,8962 | 0,0067 | 0,0078 | 0,0016 | 0,0011 | 10,0166 | 11,6844 | 2,3587 |
| | | R2 | 26,3710 | 19,5546 | 0,0089 | | | | 13,3523 | | |
| T11 | V3D1H2 | R1 | 28,4626 | 18,9385 | 0,0014 | 0,0011 | 0,0003 | 0,0002 | 1,0746 | 0,9020 | 0,2442 |
| | | R2 | 28,4680 | 18,3846 | 0,0009 | | | | 0,7293 | | |
| T12 | V4D1H2 | R1 | 27,4257 | 17,3953 | 0,0010 | 0,0010 | 0,0000 | 0,0000 | 2,4827 | 2,5516 | 0,0974 |
| | | R2 | 28,3478 | 18,3953 | 0,0010 | | | | 2,6205 | | |
| T13 | V1D2H2 | R1 | 30,9856 | 18,8914 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 | 0,4324 | 0,4455 | 0,0184 |
| | | R2 | 30,6161 | 18,6063 | 0,0002 | | | | 0,4585 | | |
| T14 | V2D2H2 | R1 | 28,1066 | 19,4524 | 0,0025 | 0,0027 | 0,0003 | 0,0002 | 3,7355 | 4,0891 | 0,5001 |
| | | R2 | 27,9381 | 19,5340 | 0,0030 | | | | 4,4428 | | |
| T15 | V3D2H2 | R1 | 30,0266 | 20,9313 | 0,0018 | 0,0019 | 0,0001 | 0,0001 | 1,4465 | 1,5024 | 0,0790 |
| | | R2 | 30,0643 | 21,0763 | 0,0020 | | | | 1,5582 | | |
| T16 | V4D2H2 | R1 | 28,1983 | 18,1058 | 0,0009 | 0,0010 | 0,0001 | 0,0001 | 2,3782 | 2,5485 | 0,2409 |
| | | R2 | 27,7894 | 17,8900 | 0,0010 | | | | 2,7189 | | |
| T17 | V1D1H3 | R1 | 31,5030 | 17,9153 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1536 | 0,2025 | 0,0692 |
| | | R2 | 30,9982 | 18,1215 | 0,0001 | | | | 0,2514 | | |
| T18 | V2D1H3 | R1 | 29,1966 | 16,7677 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2729 | 0,2280 | 0,0635 |
| | | R2 | 29,0712 | 16,0663 | 0,0001 | | | | 0,1831 | | |
| T19 | V3D1H3 | R1 | 29,8643 | 17,0364 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1088 | 0,1076 | 0,0017 |
| | | R2 | 30,3129 | 17,4530 | 0,0001 | | | | 0,1064 | | |
| T20 | V4D1H3 | R1 | 31,1775 | 18,9422 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 | 0,5385 | 0,4814 | 0,0807 |
| | | R2 | 31,4004 | 18,8212 | 0,0002 | | | | 0,4243 | | |
| T21 | V1D2H3 | R1 | 30,8097 | 17,6250 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2031 | 0,2080 | 0,0069 |
| | | R2 | 30,8393 | 17,7226 | 0,0001 | | | | 0,2129 | | |
| T22 | V2D2H3 | R1 | 30,6041 | 19,0303 | 0,0003 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0000 | 0,4937 | 0,4638 | 0,0423 |
| | | R2 | 30,1619 | 18,4017 | 0,0003 | | | | 0,4338 | | |
| T23 | V3D2H3 | R1 | 29,0314 | 20,2239 | 0,0022 | 0,0021 | 0,0002 | 0,0001 | 1,7660 | 1,6540 | 0,1584 |
| | | R2 | 29,0314 | 20,0282 | 0,0019 | | | | 1,5419 | | |
| T24 | V2D2H3 | R1 | 28,5435 | 18,0367 | 0,0007 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0000 | 1,7846 | 1,6592 | 0,1772 |
| | | R2 | 29,1963 | 18,4711 | 0,0006 | | | | 1,5339 | | |
| T25 | V1D1H4 | R1 | 25,9862 | 19,0518 | 0,0082 | 0,0091 | 0,0013 | 0,0009 | 15,4594 | 17,2552 | 2,5397 |
| | | R2 | 25,4530 | 18,8200 | 0,0101 | | | | 19,0511 | | |
| T26 | V2D1H4 | R1 | 26,0537 | 15,9794 | 0,0009 | 0,0012 | 0,0004 | 0,0003 | 1,3959 | 1,7800 | 0,5433 |
| | | R2 | 25,9799 | 16,5383 | 0,0014 | | | | 2,1642 | | |
| T27 | V3D1H4 | R1 | 25,6394 | 19,8329 | 0,0179 | 0,0232 | 0,0076 | 0,0053 | 14,1368 | 18,3629 | 5,9766 |
| | | R2 | 25,3017 | 20,1713 | 0,0285 | | | | 22,5890 | | |
| T28 | V4D1H4 | R1 | 28,5435 | 18,5797 | 0,0010 | 0,0008 | 0,0003 | 0,0002 | 2,6000 | 2,1041 | 0,7013 |
| | | R2 | 28,6497 | 17,9928 | 0,0006 | | | | 1,6082 | | |
| T29 | V1D2H4 | R1 | 30,6825 | 20,2181 | 0,0007 | 0,0007 | 0,0000 | 0,0000 | 1,3383 | 1,2786 | 0,0845 |
| | | R2 | 30,3962 | 19,7968 | 0,0006 | | | | 1,2188 | | |
| T30 | V2D2H4 | R1 | 36,6748 | 30,9615 | 0,0191 | 0,0173 | 0,0025 | 0,0018 | 28,6844 | 26,0439 | 3,7342 |
| | | R2 | 35,6748 | 29,6679 | 0,0156 | | | | 23,4034 | | |
| T31 | V3D2H4 | R1 | 27,6156 | 17,8095 | 0,0011 | 0,0015 | 0,0005 | 0,0004 | 0,8839 | 1,1695 | 0,4039 |
| | | R2 | 27,2623 | 18,1754 | 0,0018 | | | | 1,4551 | | |
| T32 | V4D2H4 | R1 | 31,3956 | 20,6654 | 0,0006 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0001 | 1,5285 | 1,6591 | 0,1848 |
| | | R2 | 31,4242 | 20,9216 | 0,0007 | | | | 1,7898 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| T33 | V1D1H5 | R1 | 31,3981 | 18,4035 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2317 | 0,2557 | 0,0340 |
| | | R2 | 30,7879 | 18,0652 | 0,0001 | | | | 0,2797 | | |
| T34 | V2D1H5 | R1 | 30,1152 | 20,9326 | 0,0017 | 0,0015 | 0,0003 | 0,0002 | 2,5900 | 2,3184 | 0,3840 |
| | | R2 | 30,0232 | 20,5011 | 0,0014 | | | | 2,0469 | | |
| T35 | V3D1H5 | R1 | 30,8653 | 23,4736 | 0,0060 | 0,0055 | 0,0006 | 0,0004 | 4,7118 | 4,3899 | 0,4552 |
| | | R2 | 31,9826 | 24,3790 | 0,0051 | | | | 4,0680 | | |
| T36 | V4D1H5 | R1 | 28,5249 | 14,1625 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1233 | 0,1424 | 0,0271 |
| | | R2 | 27,4272 | 13,4555 | 0,0001 | | | | 0,1616 | | |
| T37 | V1D2H5 | R1 | 30,4428 | 16,3948 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1116 | 0,0922 | 0,0275 |
| | | R2 | 30,6363 | 15,9713 | 0,0000 | | | | 0,0728 | | |
| T38 | V2D2H5 | R1 | 32,9426 | 17,6092 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0365 | 0,0322 | 0,0060 |
| | | R2 | 32,9426 | 17,2300 | 0,0000 | | | | 0,0280 | | |
| T39 | V3D2H5 | R1 | 28,5601 | 16,8631 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,2383 | 0,1898 | 0,0686 |
| | | R2 | 29,4065 | 16,9547 | 0,0002 | | | | 0,1412 | | |
| T40 | V4D2H5 | R1 | 29,4644 | 21,4811 | 0,0040 | 0,0048 | 0,0011 | 0,0008 | 10,2611 | 12,3491 | 2,9530 |
| | | R2 | 29,4141 | 21,9234 | 0,0056 | | | | 14,4372 | | |

Tabla 17. Resultados del análisis del Gen SODc

| Tratamiento | Codificación | Repetición | Gen de estudio | Gen constitutivo de referencia | Est/Ref | Promedio | SD | SE | Expresión del gen | Promedio | Desviación estándar |
|-------------|--------------|------------|----------------|--------------------------------|---------|----------|--------|--------|-------------------|----------|---------------------|
| C1 | V1C1H0 | R1 | 20,9285 | 17,6256 | 0,1013 | 0,2795 | 0,2519 | 0,1781 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 20,7500 | 19,6222 | 0,4576 | | | | 1,0000 | | |
| C2 | V2C1H0 | R1 | 18,3789 | 14,4784 | 0,0670 | 0,0609 | 0,0086 | 0,0061 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 18,6212 | 14,4319 | 0,0548 | | | | 1,0000 | | |
| C3 | V3C1H0 | R1 | 20,6787 | 17,4251 | 0,1048 | 0,0806 | 0,0343 | 0,0243 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 21,2114 | 17,0611 | 0,0563 | | | | 1,0000 | | |
| C4 | V4C1H0 | R1 | 24,4241 | 13,1620 | 0,0004 | 0,0091 | 0,0123 | 0,0087 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 |
| | | R2 | 24,6990 | 18,8918 | 0,0179 | | | | 1,0000 | | |
| T1 | V1D1H1 | R1 | 23,5580 | 15,5117 | 0,0038 | 0,0034 | 0,0005 | 0,0004 | 0,0135 | 0,0121 | 0,0020 |
| | | R2 | 23,8639 | 15,4856 | 0,0030 | | | | 0,0108 | | |
| T2 | V2D1H1 | R1 | 19,0326 | 15,9314 | 0,1165 | 0,1468 | 0,0429 | 0,0303 | 1,9140 | 2,4118 | 0,7041 |
| | | R2 | 18,5197 | 16,0228 | 0,1772 | | | | 2,9096 | | |
| T3 | V3D1H1 | R1 | 20,7515 | 19,0370 | 0,3047 | 0,2715 | 0,0470 | 0,0333 | 3,7814 | 3,3687 | 0,5837 |
| | | R2 | 20,9219 | 18,8521 | 0,2382 | | | | 2,9559 | | |
| T4 | V4D1H1 | R1 | 22,5611 | 17,9339 | 0,0405 | 0,0471 | 0,0094 | 0,0067 | 4,4306 | 5,1603 | 1,0319 |
| | | R2 | 21,9697 | 17,7532 | 0,0538 | | | | 5,8900 | | |
| T5 | V1D2H1 | R1 | 24,6308 | 19,8030 | 0,0352 | 0,0408 | 0,0080 | 0,0056 | 0,1260 | 0,1461 | 0,0284 |
| | | R2 | 23,2498 | 18,8218 | 0,0465 | | | | 0,1662 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| T6 | V2D2H1 | R1 | 18,8939 | 17,4481 | 0,3671 | 0,2976 | 0,0982 | 0,0695 | 6,0290 | 4,8882 | 1,6134 |
| | | R2 | 19,5958 | 17,4639 | 0,2282 | | | | 3,7473 | | |
| T7 | V3D2H1 | R1 | 24,5927 | 20,9250 | 0,0787 | 0,0807 | 0,0029 | 0,0021 | 0,9765 | 1,0020 | 0,0360 |
| | | R2 | 24,3001 | 20,7058 | 0,0828 | | | | 1,0275 | | |
| T8 | V4D2H1 | R1 | 22,2023 | 17,0657 | 0,0284 | 0,0275 | 0,0013 | 0,0009 | 3,1126 | 3,0136 | 0,1400 |
| | | R2 | 21,9099 | 16,6785 | 0,0266 | | | | 2,9146 | | |
| T9 | V1D1H2 | R1 | 21,9279 | 13,4548 | 0,0028 | 0,0024 | 0,0006 | 0,0005 | 0,0101 | 0,0084 | 0,0023 |
| | | R2 | 22,9989 | 13,9566 | 0,0019 | | | | 0,0068 | | |
| T10 | V2D1H2 | R1 | 18,1486 | 18,8962 | 1,6790 | 1,4150 | 0,3734 | 0,2640 | 27,5755 | 23,2391 | 6,1326 |
| | | R2 | 19,7526 | 19,9555 | 1,1509 | | | | 18,9026 | | |
| T11 | V3D1H2 | R1 | 22,1531 | 18,9385 | 0,1077 | 0,0930 | 0,0208 | 0,0147 | 1,3368 | 1,1545 | 0,2579 |
| | | R2 | 22,4908 | 18,8167 | 0,0783 | | | | 0,9721 | | |
| T12 | V4D1H2 | R1 | 22,8796 | 18,9498 | 0,0656 | 0,0527 | 0,0182 | 0,0129 | 7,1850 | 5,7756 | 1,9932 |
| | | R2 | 22,0436 | 17,3953 | 0,0399 | | | | 4,3662 | | |
| T13 | V1D2H2 | R1 | 23,0610 | 18,8914 | 0,0556 | 0,0443 | 0,0160 | 0,0113 | 0,1988 | 0,1584 | 0,0572 |
| | | R2 | 23,5298 | 18,6063 | 0,0330 | | | | 0,1179 | | |
| T14 | V2D2H2 | R1 | 23,3545 | 19,4524 | 0,0669 | 0,0692 | 0,0033 | 0,0023 | 1,0986 | 1,1368 | 0,0540 |
| | | R2 | 23,3391 | 19,5340 | 0,0715 | | | | 1,1750 | | |
| T15 | V3D2H2 | R1 | 24,5408 | 20,1313 | 0,0471 | 0,0598 | 0,0180 | 0,0128 | 0,5839 | 0,7423 | 0,2239 |
| | | R2 | 24,8607 | 21,0763 | 0,0726 | | | | 0,9006 | | |
| T16 | V4D2H2 | R1 | 18,9980 | 17,1058 | 0,2694 | 0,2225 | 0,0663 | 0,0469 | 29,4973 | 24,3603 | 7,2648 |
| | | R2 | 20,4000 | 17,8900 | 0,1756 | | | | 19,2233 | | |
| T17 | V1D1H3 | R1 | 24,9054 | 17,9153 | 0,0079 | 0,0088 | 0,0013 | 0,0009 | 0,0281 | 0,0313 | 0,0045 |
| | | R2 | 24,8172 | 18,1215 | 0,0096 | | | | 0,0345 | | |
| T18 | V2D1H3 | R1 | 23,7311 | 16,7677 | 0,0080 | 0,0075 | 0,0008 | 0,0005 | 0,1316 | 0,1226 | 0,0128 |
| | | R2 | 23,8424 | 16,6663 | 0,0069 | | | | 0,1136 | | |
| T19 | V3D1H3 | R1 | 23,9952 | 17,0364 | 0,0080 | 0,0082 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0998 | 0,1023 | 0,0036 |
| | | R2 | 22,3405 | 15,4530 | 0,0084 | | | | 0,1048 | | |
| T20 | V4D1H3 | R1 | 24,0757 | 18,9422 | 0,0285 | 0,0231 | 0,0077 | 0,0054 | 3,1192 | 2,5240 | 0,8417 |
| | | R2 | 24,6482 | 18,8212 | 0,0176 | | | | 1,9289 | | |
| T21 | V1D2H3 | R1 | 24,0560 | 18,6250 | 0,0232 | 0,0219 | 0,0018 | 0,0013 | 0,0829 | 0,0783 | 0,0066 |
| | | R2 | 23,3259 | 17,7226 | 0,0206 | | | | 0,0736 | | |
| T22 | V2D2H3 | R1 | 25,4287 | 19,0303 | 0,0119 | 0,0105 | 0,0019 | 0,0013 | 0,1947 | 0,1730 | 0,0307 |
| | | R2 | 25,5637 | 18,8017 | 0,0092 | | | | 0,1513 | | |
| T23 | V3D2H3 | R1 | 22,7661 | 20,2239 | 0,1717 | 0,1371 | 0,0489 | 0,0346 | 2,1305 | 1,7010 | 0,6074 |
| | | R2 | 23,3151 | 20,0282 | 0,1025 | | | | 1,2715 | | |
| T24 | V2D2H3 | R1 | 23,1827 | 18,0367 | 0,0282 | 0,0232 | 0,0071 | 0,0050 | 3,0925 | 2,5421 | 0,7783 |
| | | R2 | 23,2518 | 17,4711 | 0,0182 | | | | 1,9917 | | |
| T25 | V1D1H4 | R1 | 24,8960 | 19,0518 | 0,0174 | 0,0199 | 0,0036 | 0,0025 | 0,0623 | 0,0713 | 0,0128 |
| | | R2 | 24,2960 | 18,8200 | 0,0225 | | | | 0,0804 | | |
| T26 | V2D1H4 | R1 | 19,0208 | 16,4794 | 0,1718 | 0,2078 | 0,0510 | 0,0360 | 2,8212 | 3,4131 | 0,8371 |
| | | R2 | 18,5742 | 16,5383 | 0,2439 | | | | 4,0050 | | |
| T27 | V3D1H4 | R1 | 23,4966 | 19,8329 | 0,0789 | 0,0711 | 0,0110 | 0,0078 | 0,9792 | 0,8826 | 0,1366 |
| | | R2 | 24,6938 | 20,7131 | 0,0633 | | | | 0,7861 | | |
| T28 | V4D1H4 | R1 | 24,3711 | 18,5797 | 0,0181 | 0,0159 | 0,0031 | 0,0022 | 1,9770 | 1,7380 | 0,3381 |
| | | R2 | 24,1835 | 17,9928 | 0,0137 | | | | 1,4989 | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------|----|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| T29 | V1D2H4 | R1 | 25,6158 | 20,2181 | 0,0237 | 0,0246 | 0,0013 | 0,0009 | 0,0849 | 0,0880 | 0,0045 |
| | | R2 | 26,0905 | 20,7968 | 0,0255 | | | | 0,0912 | | |
| T30 | V2D2H4 | R1 | 32,8272 | 33,9615 | 2,1950 | 1,8973 | 0,4210 | 0,2977 | 36,0505 | 31,1608 | 6,9151 |
| | | R2 | 31,9902 | 32,6679 | 1,5996 | | | | 26,2711 | | |
| T31 | V3D2H4 | R1 | 24,0405 | 17,5095 | 0,0108 | 0,0130 | 0,0031 | 0,0022 | 0,1342 | 0,1618 | 0,0390 |
| | | R2 | 23,2098 | 17,1754 | 0,0153 | | | | 0,1893 | | |
| T32 | V4D2H4 | R1 | 28,5936 | 20,6654 | 0,0041 | 0,0043 | 0,0003 | 0,0002 | 0,4495 | 0,4706 | 0,0298 |
| | | R2 | 29,7206 | 21,9216 | 0,0045 | | | | 0,4917 | | |
| T33 | V1D1H5 | R1 | 24,3982 | 18,4035 | 0,0157 | 0,0142 | 0,0021 | 0,0015 | 0,0561 | 0,0508 | 0,0076 |
| | | R2 | 24,7647 | 18,4652 | 0,0127 | | | | 0,0454 | | |
| T34 | V2D1H5 | R1 | 25,3989 | 20,9326 | 0,0452 | 0,0480 | 0,0039 | 0,0028 | 0,7430 | 0,7886 | 0,0645 |
| | | R2 | 24,8003 | 20,5011 | 0,0508 | | | | 0,8342 | | |
| T35 | V3D1H5 | R1 | 26,2103 | 23,6736 | 0,1723 | 0,1915 | 0,0271 | 0,0191 | 2,1387 | 2,3761 | 0,3357 |
| | | R2 | 25,6265 | 23,3790 | 0,2106 | | | | 2,6135 | | |
| T36 | V4D1H5 | R1 | 20,3153 | 14,6246 | 0,0194 | 0,0166 | 0,0039 | 0,0027 | 2,1199 | 1,8197 | 0,4246 |
| | | R2 | 22,6267 | 16,4555 | 0,0139 | | | | 1,5194 | | |
| T37 | V1D2H5 | R1 | 23,7651 | 16,3948 | 0,0060 | 0,0062 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0216 | 0,0223 | 0,0009 |
| | | R2 | 22,8561 | 15,5713 | 0,0064 | | | | 0,0229 | | |
| T38 | V2D2H5 | R1 | 24,0168 | 17,6092 | 0,0118 | 0,0123 | 0,0007 | 0,0005 | 0,1935 | 0,2018 | 0,0118 |
| | | R2 | 23,5180 | 17,2300 | 0,0128 | | | | 0,2102 | | |
| T39 | V3D2H5 | R1 | 23,3092 | 17,8631 | 0,0229 | 0,0239 | 0,0014 | 0,0010 | 0,2847 | 0,2970 | 0,0175 |
| | | R2 | 24,1807 | 18,8547 | 0,0249 | | | | 0,3094 | | |
| T40 | V4D2H5 | R1 | 24,5374 | 21,4811 | 0,1202 | 0,1451 | 0,0353 | 0,0249 | 13,1633 | 15,8930 | 3,8604 |
| | | R2 | 24,4792 | 21,9234 | 0,1701 | | | | 18,6228 | | |

Anexo 3. Análisis estadístico con los datos obtenidos

Tabla 18. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen GST20

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:VARIEDAD | 86,6996 | 3 | 28,8999 | 47,19 | 0,0000 |
| B:DOSIS | 3,24673 | 1 | 3,24673 | 5,30 | 0,0267 |
| C:TIEMPO | 63,305 | 4 | 15,8262 | 25,84 | 0,0000 |
| D:REPETICIONES | 0,111587 | 1 | 0,111587 | 0,18 | 0,6718 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 7,53734 | 3 | 2,51245 | 4,10 | 0,0127 |
| AC | 113,837 | 12 | 9,48641 | 15,49 | 0,0000 |
| BC | 10,7488 | 4 | 2,68721 | 4,39 | 0,0050 |
| ABC | 92,3187 | 12 | 7,69323 | 12,56 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 23,8862 | 39 | 0,612466 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 401,691 | 79 | | | |

Tabla 19. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Variedad

| <i>VARIEDAD</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 20 | 0,08291 | 0,174995 | c |
| 4 | 20 | 1,19932 | 0,174995 | b |
| 2 | 20 | 2,29426 | 0,174995 | a |
| 3 | 20 | 2,77956 | 0,174995 | a |

Tabla 20. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Dosis

| <i>DOSIS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 40 | 1,38756 | 0,12374 | b |
| 2 | 40 | 1,79047 | 0,12374 | a |

Tabla 21. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Tiempo

| <i>TIEMPO</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 48 | 16 | 0,586419 | 0,19565 | c |
| 168 | 16 | 1,28489 | 0,19565 | bc |
| 12 | 16 | 1,37463 | 0,19565 | bc |
| 24 | 16 | 1,43961 | 0,19565 | b |
| 72 | 16 | 3,25952 | 0,19565 | a |

Tabla 22. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen GST20 por Tratamientos

| <i>TRATAMIENTOS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| T9 | 2 | 0,00325 | 0,553383 | g |
| T1 | 2 | 0,00425 | 0,553383 | g |
| T17 | 2 | 0,00585 | 0,553383 | g |
| T37 | 2 | 0,035 | 0,553383 | g |
| T13 | 2 | 0,04785 | 0,553383 | g |
| T21 | 2 | 0,0633 | 0,553383 | g |
| T5 | 2 | 0,0796 | 0,553383 | g |
| T33 | 2 | 0,0877 | 0,553383 | g |
| T19 | 2 | 0,10405 | 0,553383 | g |
| T32 | 2 | 0,16705 | 0,553383 | fg |
| T36 | 2 | 0,19505 | 0,553383 | fg |
| T29 | 2 | 0,22145 | 0,553383 | fg |
| T25 | 2 | 0,28085 | 0,553383 | efg |
| T6 | 2 | 0,2844 | 0,553383 | efg |
| T39 | 2 | 0,32345 | 0,553383 | efg |
| T16 | 2 | 0,3603 | 0,553383 | efg |
| T38 | 2 | 0,37445 | 0,553383 | efg |
| T18 | 2 | 0,4711 | 0,553383 | efg |
| T20 | 2 | 0,48455 | 0,553383 | efg |
| T2 | 2 | 0,50445 | 0,553383 | efg |
| T11 | 2 | 1,02295 | 0,553383 | defg |
| T22 | 2 | 1,0499 | 0,553383 | defg |
| T23 | 2 | 1,10735 | 0,553383 | defg |
| T28 | 2 | 1,1584 | 0,553383 | defg |
| T12 | 2 | 1,1852 | 0,553383 | defg |
| T34 | 2 | 1,3818 | 0,553383 | defg |
| T24 | 2 | 1,40525 | 0,553383 | defg |
| T4 | 2 | 1,44865 | 0,553383 | cdefg |
| T3 | 2 | 1,86285 | 0,553383 | cdefg |
| T10 | 2 | 2,0453 | 0,553383 | cdefg |
| T14 | 2 | 2,126 | 0,553383 | cdefg |
| T40 | 2 | 2,2948 | 0,553383 | cdefg |
| T8 | 2 | 3,29395 | 0,553383 | bcdefg |
| T31 | 2 | 3,44555 | 0,553383 | bcdef |
| T7 | 2 | 3,51885 | 0,553383 | bcde |
| T26 | 2 | 3,8204 | 0,553383 | bcd |
| T15 | 2 | 4,72605 | 0,553383 | bc |
| T35 | 2 | 5,58685 | 0,553383 | b |
| T27 | 2 | 6,09765 | 0,553383 | b |
| T30 | 2 | 10,8848 | 0,553383 | a |

Tabla 23. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen PCS1

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:VARIEDAD | 90,0771 | 3 | 30,0257 | 15,06 | 0,0000 |
| B:DOSIS | 1,14362 | 1 | 1,14362 | 0,57 | 0,4534 |
| C:TIEMPO | 585,929 | 4 | 146,482 | 73,47 | 0,0000 |
| D:REPETICIONES | 2,58545 | 1 | 2,58545 | 1,30 | 0,2617 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 152,008 | 3 | 50,6693 | 25,41 | 0,0000 |
| AC | 473,031 | 12 | 39,4192 | 19,77 | 0,0000 |
| BC | 44,5581 | 4 | 11,1395 | 5,59 | 0,0012 |
| ABC | 1228,27 | 12 | 102,356 | 51,34 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 77,7557 | 39 | 1,99374 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 2655,36 | 79 | | | |

Tabla 24. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Variedad

| <i>VARIEDAD</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 20 | 2,24326 | 0,315732 | c |
| 4 | 20 | 3,44418 | 0,315732 | b |
| 3 | 20 | 3,60065 | 0,315732 | b |
| 2 | 20 | 5,22544 | 0,315732 | a |

Tabla 25. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Dosis

| <i>DOSIS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 2 | 40 | 3,50882 | 0,223256 | a |
| 1 | 40 | 3,74794 | 0,223256 | a |

Tabla 26. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Tiempo

| <i>TIEMPO</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 48 | 16 | 0,625556 | 0,352999 | c |
| 168 | 16 | 2,47123 | 0,352999 | b |
| 24 | 16 | 3,00504 | 0,352999 | b |
| 12 | 16 | 3,33339 | 0,352999 | b |
| 72 | 16 | 8,70668 | 0,352999 | a |

Tabla 27. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen PCS1 por Tratamientos

| <i>TRATAMIENTOS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| T38 | 2 | 0,03225 | 0,998433 | g |
| T37 | 2 | 0,0922 | 0,998433 | g |
| T19 | 2 | 0,1076 | 0,998433 | g |
| T36 | 2 | 0,14245 | 0,998433 | g |
| T39 | 2 | 0,18975 | 0,998433 | g |
| T17 | 2 | 0,2025 | 0,998433 | g |
| T21 | 2 | 0,208 | 0,998433 | g |
| T1 | 2 | 0,2226 | 0,998433 | g |
| T18 | 2 | 0,228 | 0,998433 | g |
| T33 | 2 | 0,2557 | 0,998433 | g |
| T9 | 2 | 0,31685 | 0,998433 | g |
| T13 | 2 | 0,44545 | 0,998433 | g |
| T22 | 2 | 0,46375 | 0,998433 | g |
| T20 | 2 | 0,4814 | 0,998433 | g |
| T11 | 2 | 0,90195 | 0,998433 | g |
| T31 | 2 | 1,1695 | 0,998433 | g |
| T29 | 2 | 1,27855 | 0,998433 | g |
| T15 | 2 | 1,50235 | 0,998433 | g |
| T23 | 2 | 1,65395 | 0,998433 | g |
| T32 | 2 | 1,65915 | 0,998433 | g |
| T24 | 2 | 1,65925 | 0,998433 | g |
| T2 | 2 | 1,75995 | 0,998433 | g |
| T26 | 2 | 1,78005 | 0,998433 | g |
| T3 | 2 | 1,80655 | 0,998433 | g |
| T28 | 2 | 2,1041 | 0,998433 | g |
| T5 | 2 | 2,15545 | 0,998433 | fg |
| T34 | 2 | 2,31845 | 0,998433 | fg |
| T16 | 2 | 2,54855 | 0,998433 | fg |
| T12 | 2 | 2,5516 | 0,998433 | fg |
| T8 | 2 | 2,85955 | 0,998433 | fg |
| T6 | 2 | 3,8544 | 0,998433 | fg |
| T14 | 2 | 4,08915 | 0,998433 | fg |
| T35 | 2 | 4,3899 | 0,998433 | fg |
| T7 | 2 | 5,92205 | 0,998433 | efg |
| T4 | 2 | 8,0866 | 0,998433 | def |
| T10 | 2 | 11,6845 | 0,998433 | cde |
| T40 | 2 | 12,3491 | 0,998433 | cd |
| T25 | 2 | 17,2552 | 0,998433 | bc |
| T27 | 2 | 18,3629 | 0,998433 | b |
| T30 | 2 | 26,0439 | 0,998433 | a |

Tabla 28. Análisis de Varianza para la Expresión del Gen SODc

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:VARIEDAD | 714,829 | 3 | 238,276 | 60,47 | 0,0000 |
| B:DOSIS | 55,067 | 1 | 55,067 | 13,97 | 0,0006 |
| C:TIEMPO | 362,629 | 4 | 90,6573 | 23,01 | 0,0000 |
| D:REPETICIONES | 10,8639 | 1 | 10,8639 | 2,76 | 0,1049 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 130,883 | 3 | 43,6278 | 11,07 | 0,0000 |
| AC | 1093,41 | 12 | 91,1178 | 23,12 | 0,0000 |
| BC | 148,618 | 4 | 37,1545 | 9,43 | 0,0000 |
| ABC | 1493,23 | 12 | 124,436 | 31,58 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 153,685 | 39 | 3,94063 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 4163,22 | 79 | | | |

Tabla 29. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Variedad

| <i>VARIEDAD</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 20 | 0,0667 | 0,443882 | b |
| 3 | 20 | 1,17882 | 0,443882 | b |
| 4 | 20 | 6,32972 | 0,443882 | a |
| 2 | 20 | 6,75357 | 0,443882 | a |

Tabla 30. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Dosis

| <i>DOSIS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 40 | 2,75254 | 0,313872 | b |
| 2 | 40 | 4,41187 | 0,313872 | a |




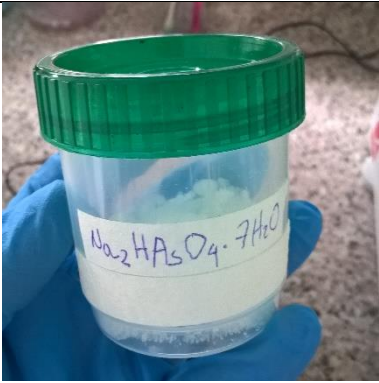
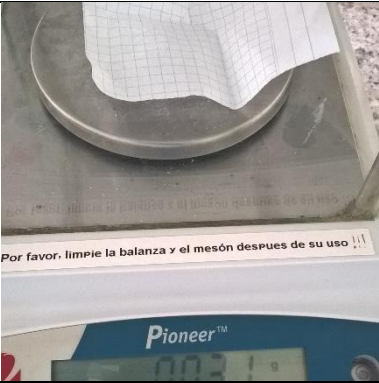

Tabla 31. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Tiempo

| <i>TIEMPO</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 48 | 16 | 0,909325 | 0,496276 | c |
| 12 | 16 | 2,50034 | 0,496276 | c |
| 168 | 16 | 2,68116 | 0,496276 | c |
| 72 | 16 | 4,74828 | 0,496276 | b |
| 24 | 16 | 7,07191 | 0,496276 | a |

Tabla 32. Prueba de Tukey para la Expresión del Gen SODc por Tratamientos

| <i>TRATAMIENTOS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| T9 | 2 | 0,00845 | 1,40368 | c |
| T1 | 2 | 0,01215 | 1,40368 | c |
| T37 | 2 | 0,02225 | 1,40368 | c |
| T17 | 2 | 0,0313 | 1,40368 | c |
| T33 | 2 | 0,05075 | 1,40368 | c |
| T25 | 2 | 0,07135 | 1,40368 | c |
| T21 | 2 | 0,07825 | 1,40368 | c |
| T29 | 2 | 0,08805 | 1,40368 | c |
| T19 | 2 | 0,1023 | 1,40368 | c |
| T18 | 2 | 0,1226 | 1,40368 | c |
| T5 | 2 | 0,1461 | 1,40368 | c |
| T13 | 2 | 0,15835 | 1,40368 | c |
| T31 | 2 | 0,16175 | 1,40368 | c |
| T22 | 2 | 0,173 | 1,40368 | c |
| T38 | 2 | 0,20185 | 1,40368 | c |
| T39 | 2 | 0,29705 | 1,40368 | c |
| T32 | 2 | 0,4706 | 1,40368 | c |
| T15 | 2 | 0,74225 | 1,40368 | c |
| T34 | 2 | 0,7886 | 1,40368 | c |
| T27 | 2 | 0,88265 | 1,40368 | c |
| T7 | 2 | 1,002 | 1,40368 | c |
| T14 | 2 | 1,1368 | 1,40368 | c |
| T11 | 2 | 1,15445 | 1,40368 | c |
| T23 | 2 | 1,701 | 1,40368 | c |
| T28 | 2 | 1,73795 | 1,40368 | c |
| T36 | 2 | 1,81965 | 1,40368 | c |
| T35 | 2 | 2,3761 | 1,40368 | c |
| T2 | 2 | 2,4118 | 1,40368 | c |
| T20 | 2 | 2,52405 | 1,40368 | c |
| T24 | 2 | 2,5421 | 1,40368 | c |
| T8 | 2 | 3,0136 | 1,40368 | c |
| T3 | 2 | 3,36865 | 1,40368 | c |
| T26 | 2 | 3,4131 | 1,40368 | c |
| T6 | 2 | 4,88815 | 1,40368 | c |
| T4 | 2 | 5,1603 | 1,40368 | c |
| T12 | 2 | 5,7756 | 1,40368 | c |
| T40 | 2 | 15,8931 | 1,40368 | b |
| T10 | 2 | 23,239 | 1,40368 | ab |
| T16 | 2 | 24,3603 | 1,40368 | a |
| T30 | 2 | 31,1608 | 1,40368 | a |

Anexo 4. Fotografías

| | |
|---|---|
|  |  |
| <p>Preparación del sustrato para la siembra de las semillas de <i>Chenopodium quinoa</i>.</p> | <p>Siembra y germinación de las plántulas de quinua.</p> |
|  |  |
| <p>Lectura diaria de la temperatura y humedad relativa durante el cultivo</p> | <p>Arseniato dibásico de sodio utilizado en el experimento.</p> |
|  |  |
| <p>Determinación de los pesos de arseniato preparados.</p> | <p>Soluciones de arseniato para la aplicación en el sustrato de las plántulas, a nivel radicular.</p> |

| | |
|--|---|
|  |  |
| <p>Extracción de ARN con el uso de H_líquido además de otros reactivos siguiendo el protocolo determinado.</p> | <p>Análisis de la expresión de genes, método de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (Polymerase Chain Reaction, qPCR) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial del equipo (Applied Biosystems)</p> |